Aus der Neurologischen Universitätsklinik Charlottenburg
Professor Dr. med. Janz

IMMUNZYTOLOGISCHE LYMPHOZYTENTYPISIERUNG IM LIQUOR BEI PATIENTEN MIT MULTIPLER SKLEROSE UND ANDEREN NEUROLOGISCHEN ERKRANKUNGEN. — EINFÜHRUNG EINER ROUTINEMETHODE IN DIE IMMUNZYTOLOGISCHE LIQUORDIAGNOSTIK.

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von:
Birgit Basedow
aus Bad Kreuznach

1986

Aus der Neurologischen Universitätsklinik Charlottenburg

Professor Dr. med. Janz

IMMUNZYTOLOGISCHE LYMPHOZYTENTYPISIERUNG IM LIQUOR BEI PATIENTEN MIT MULTIPLER SKLEROSE UND ANDEREN NEUROLOGISCHEN ERKRANKUNGEN. - EINFÜHRUNG EINER ROUTINEMETHODE IN DIE IMMUNZYTOLOGISCHE LIQUORDIAGNOSTIK.

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von:

Birgit Basedow

aus Bad Kreuznach

Referent: Prof. Dr. med. Kölmel

Korreferent: Prof. Dr. med. Diamantstein

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 18. 8. 1986

in memoriam

meinem Vater,

Günter B. gewidmet.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549614_0048

DANKSAGUNG

Herr Professor Dr. Kölmel, Leiter des Liquorzytologischen Labors an der Neurologischen Universitätsklinik Charlottenburg und Herr Professor Dr. Janz, Leiter der Klinik, gaben mir die Möglichkeit, mich als Doktorandin in die Liquorzytologie einzuarbeiten und gleichzeitig erste Einblicke in die Neuroimmunologie zu gewinnen.

Professor Dr. Kölmel überließ mir das Thema zu dieser Abhandlung und förderte stets wohlwollend und großzügig meine auf die Dissertation ausgerichtete Arbeit. Dafür habe ich ihm besonders zu danken.

Die handwerklichen Fertigkeiten der leitenden MTA Frau Borowski und ihre lebhafte Anteilnahme am Fortgang der Experimente waren mir in den technischen Dingen wiederholt eine wertvolle Hilfe.

Dank schulde ich auch den Kollegen, medizinisch-technischen Assistentinnen und Schwestern, die durch ihre Bereitwilligkeit und Aufmerksamkeit zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
EINLEITUNG	1
Kurzer Abriß der Geschichte der Liquorzytologie und Überblick über den Stand der klinischen Immunologie bei neurologischen Erkrankungen	
Darstellung der Aufgabenstellung	14
MATERIAL UND METHODE	28
Methode der Zellgewinnung	30
Darstellung der Immunperoxidase-Sandwich-technik auf Liquorzellsedimenten	
ERGEBNISSE	40
Vergleich der Ergebnisse bei Anwendung der Zytozentrifugation und der Spontan-sedimentation	
Morphologische Darstellung der immuno-logischen Markierungsmuster bei Anwen-dung der Immunperoxidase-Technik	43
Quantitative Auswertung der immunolo-gischen Lymphozytentypisierung im Liquor von Gesunden (Kontrollgruppe), bei an Multipler Sklerose erkrankten Patienten und bei Patienten mit ande-ren neurologischen Erkrankungen	48

Seite

Quantitative Veränderungen der Liquorproteine bei Multiple-Sklerose-Patienten und dem Normalkollektiv 53

DISKUSSION 55

ZUSAMMENFASSUNG 63

BILDNACHWEIS UND TABELLEN 66

LITERATURVERZEICHNIS 81

LEBENSLAUF

EINLEITUNG

Die systematische Bestimmung der physiologischerweise und pathologischerweise im Liquor cerebrospinalis des Menschen vorkommenden Zellen wird bereits seit fast 100 Jahren durchgeführt.

Ursprünglich als Eingriff zur spinalen Druckentlastung wurde 1891 von Quincke die Technik der Lumbalpunktion beschrieben. (Hingegen gilt heute Liquordrucksteigerung wegen der Gefahr der zentralen Einklemmung als Kontraindikation der Lumbalpunktion.)

Allerdings hat die von Quincke beschriebene Methode zur Gewinnung des Liquors sich als wertvolles Hilfsmittel in der klinisch-neurologischen Diagnostik bewiesen.

Mit der Entwicklung der Zählkammer durch Fuchs-Rosenthal 1904, die auch heute noch verwendet wird (siehe Material und Methode), fand die quantitative Erfassung der Liquorzellen besonders in der Diagnostik der neurologisch-entzündlichen Erkrankungen rasche Verbreitung, jedoch die morphologischen Differenzierungsmöglichkeiten der Liquorzellen in dieser Kammer erwiesen sich als nicht ausreichend.

Im Vergleich zu der quantitativen Zellzählung, dem Bakteriennachweis oder der qualitativen Eiweiß- und Glucosebestimmung im Liquor war der Wert einer morphologischen Liquorzytologie infolge unzureichender Präparationstechniken bis in die 50er Jahre umstritten (Sayk 1960).

Ravault erkannte als erster die formverändernden Einflüsse auf die Liquorzellen durch die bereits damals gebräuchliche Zentrifugation des nativen Liquors.

Er führte die ersten Versuche zur Gewinnung von Liquorzellsedimenten durch Spontansedimentation und anschließendem Ausstreichen des Sediments auf Objektträgern durch.

Diese wie auch zahlreiche weitere Versuche zur Gewinnung zuverlässig beurteilbarer Liquorzellsedimente brachten jedoch keine entscheidenden Fortschritte und die Meinungsverschiedenheiten besonders bezüglich der Vor- und Nachteile der Zentrifugations- und Sedimentationsverfahren dauerten an.

1949 formulierten Bostroems und Schönenberg das theoretische Prinzip der durch Sogkräfte beschleunigten, die Liquorzellen in ihrer nativen Form weitgehendst belassenden, Spontan-Sedimentation des nativen Liquors.

Dieses theoretische Prinzip konnte 1954 von Sayk und Mitarbeitern in der von ihnen entwickelten Saykschen Sedimentationskammer zur beschleunigten und dennoch zellschonenden Sedimentation des nativen Liquors realisiert werden.

Damit bekam die Entwicklung der morphologisch differenzierenden Liquorzytologie einen Aufschwung und man konnte beginnen, die bereits 1933 von Rehm in seinem Atlas der Liquorzellbilder aufgestellte Forderung nach

Zuordnung typischer Liquorzellbilder zu bestimmten Erkrankungen des zentralen Nervensystems zu erfüllen.

Die Methode der Liquorzellgewinnung durch Spontansedimentation kombiniert mit der aus der Hämatologie bekannten Pappenheimfärbung erbrachte erstmals reproduzierbare, morphologisch eindeutig identifizierbare Zellsedimente und ermöglichte somit die systematische Auswertung des normalzelligen und pleozytären Liquors.

1960 veröffentliche Sayk seinen "Atlas der Cytologie der Cerebrospinalflüssigkeit", in dem erstmals quantitativ und qualitativ pathologische Zellbilder vorwiegend entzündlicher Erkrankungen des Zentralnervensystems zugeordnet werden konnten.

Seine Beschreibungen und Korrelationen typischer Liquorzellbilder zu bestimmten akuten und chronischen entzündlichen Erkrankungen des ZNS bilden noch heute die Grundlage der liquorzytologischen Diagnostik.

In Liquor-Zellsedimenten, gewonnen während der Reparationsphase der damals recht häufigen Pneumokokkenmeningitis, im Verlauf tuberkulöser Meningitiden, Blastomykosen- und abakteriellen Meningitiden und bei chronischer und akuter Multipler Sklerose beschrieb Sayk typischerweise vorkommende aber nicht nach den bekannten morphologisch-zytologischen Kriterien eindeutig klassifizierbare Zellformen.

So wurde von ihm bei der tuberkulösen Meningitis die sogenannte Lymphoidzelle beschrieben, die nach den bekannten morphologischen Kriterien und ihrem Färbeverhalten weder eindeutig den Lymphozyten, noch den Plas-

mazellen oder den Monozyten zuzuordnen ist.

Ebensowenig waren die zahlreichen Übergangsformen während der lymphozytären Reparationsphase der bakteriellen Meningitiden einer der damals bekannten Zellgruppen eindeutig zuzuordnen.

Bei der Blastomykosen- und abakteriellen (= viralen) Meningitiden beschrieb er ungewöhnlich große, auch mehrkernige Reizformen, deren Herkunft und pathogenetische Bedeutung unklar blieb. Im Liquor von an Multipler Sklerose Erkrankten wies er wie schon Voss (1939) vor ihm und zahlreiche Autoren nach ihm (Bischoff 1964; Schlote und Ross 1974) auf einige morphologische Besonderheiten vielfältiger "plasmozytärer Reizformen" hin.

Da Sayk diese, sowie pleozytäre Zellveränderungen nur bei 61 % der 220 untersuchten MS-Liquores fand, hingegen bei 82 % pathologische Eiweiß- und Kolloidreaktionen, interpretierte er die zellulären Befunde als unspezifische Begleitreaktion der Leptomeningen im Rahmen eines chronisch pathogenetisch und ätiologisch unklaren entzündlichen Geschehens.

Diese Schwierigkeiten der zahlreichen nicht eindeutig klassifizierbaren Reiz- und Übergangsformen besonders bei entzündlichen Prozessen des zentralen Nervensystems hat Olischer 1969 mit der Einführung zahlreicher zytochemischer Nachweismethoden für zellklassenspezifische Enzyme zu lösen versucht.

Durch diese Nachweismethoden der zelleigenen und zellklassenspezifischen Enzyme gelang die sichere Zuordnung

zahlreicher atypischer Zellformen zu der Gruppe der phagozytierenden Zellen den Monozyten und Fibroblasten einerseits und den nicht-phagozytierenden Lymphozyten andererseits (Olischer, 1969).

Jedoch auch bei diesen über rein morphologische Untersuchungen hinausreichende Zellklassifikationen blieb die pathogenetische Bedeutung sowohl der bereits nach morphologischen Kriterien eindeutig zuordenbaren Zellen als auch der atypischen Zellformen, ihre Proliferationskinetik und ihr Interaktionsmodus im Rahmen der intracerebralen Krankheitsprozesse unklar.

Hier erwies sich die in der Immunologie begonnene Zellklassifikation nach funktionsspezifischen Oberflächenantigenen auch in der Liquorzytologie als zunehmend erfolgreich.

Die Gewinnung und Produktion der gegen zelluläre Oberflächenantigene gerichteten Antiseren, und später der monoklonalen Antikörper (Köhler und Milstein 1975) ermöglichte durch selektive Elimination spezifischer antigenpositiver Zellen mittels der antikörpervermittelten Zytolyse oder durch selektive Anreicherung einer durch ein bestimmtes Oberflächenantigen definierten Zellpopulation mittels Fluore szenzaktivierten Zellsorter (FACS) die Funktion vitaler antigenpositiver Zellen sowohl in vivo als auch in vitro genau zu untersuchen (Evans 1978; Reinherz 1979; Merill 1984).

Besonders interessierten dabei die Erforschung der physiologischen immunologischen Aufgaben der durch besimmte Oberflächenantigene charakterisierbaren Zellpopulationen und ihre pathogenetische Bedeutung bei bestimmten akuten, rezidivierenden oder chronischen ent-

zündlichen, autoimmunologischen Erkrankungen des Menschen.

Breits vor fast 100 Jahren wurden die zwei grundsätzlichen Wege der Immunreaktion bei Mensch und Tier, die zellgebundene Immunantwort einerseits und die durch lösliche Faktoren vermittelte humorale Immunantwort andererseits entdeckt.

So beschrieb Robert Koch 1891 als Ausdruck einer durch zelluläre Bestandteile vermittelte Immunreaktion die Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ gegenüber Tuberkulin und bereits im Jahre 1890 wiesen Behring und Kitasaw Diphterie- und Tetanustoxin neutralisierende Aktivität im zellfreien Serum von immunisierten Tieren nach, womit die Existenz auch von löslichen, zellungebundenen Faktoren mit Aufgaben bei der Immunabwehr offenkundig wurde.

Der Nachweis, daß Antikörper spezifisch mit dem sie induzierenden Antigen reagieren, führte zur diagnostischen Anwendung von Hyperimmunseren durch Widal 1896, der die Agglutination von vibriones cholerae und Typhusbazillen durch Rekonvaleszentenserum beobachtete.

Die experimentelle Anwendung dieser Beobachtungen hatte weitreichende Auswirkungen in der gesamten Medizin und führte z.B. 1901 zur Entdeckung des klassischen Blutgruppensystems A B O durch Landsteiner.

Ein wichtiger Schritt auf dem Weg zur Entdeckung spezifischer, an den Immunvorgängen beteiligter Zellen

wurde durch die Arbeit von Landsteiner und Chase getan, die im Jahr 1942 zeigten, daß die zelluläre Immunreaktion (nachgewiesen durch die verzögerte Überempfindlichkeitsreaktion gegenüber Tuberkulin und die Abstossung eines Fremdtransplantates) durch den Transfer lymphatischer Zellen von einem Tier auf ein anderes Individuum der gleichen Spezies übertragen werden kann.

Durch Thymektomie an neugeborenen Mäusen und Bursektomie bei frisch geschlüpften Kücken konnte in den 60er Jahren die Bedeutung dieser Organe für die Heranreifung einer zellulär und humoral kompletten und funktionell intakten Immunabwehr aufgezeigt werden.

Bei den thymektomierten Tieren war der Anteil der im peripheren Blut zirkulierenden Lymphozyten und die lymphozytäre Besiedlung der paracorticalen (= Thymusabhängigen) Regionen der Lymphknoten drastisch erniedrigt. Eine Transplantatabstoßung und eine zellgebundene Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ war nicht möglich.

Auch die humorale Immunantwort gegenüber löslichen Antigenen wie Mumps- und Tetanustoxin waren deutlich abgeschwächt, was auf die Bedeutung der im Thymus herangereiften Lymphozyten auch für die humorale Immunabwehr hinwies.

Bei den bursektomierten Tieren war der Anteil der im peripheren Blut zirkulierenden Lymphozyten deutlich weniger drastisch verringert, die paracorticalen Lymphknotenareale waren normalzellig besiedelt, die lymphatischen Follikelstrukturen jedoch waren atrophisch und

Immunglobuline, die Träger der humoralen Immunantwort, waren nicht nachweisbar (Cooper 1966).

Diese Tiermodelle finden ihre Entsprechung beim Menschen in bekannten kongenitalen Immundefekten. Di George beschrieb 1965 erstmals das Syndrom der Thymushypoplasie (seltener der kompletten Thymusaplasie), kombiniert mit anderen Defekten wie fehlender Nebenschilddrüse und schweren kardiovaskulären Mißbildungen.

Diese Kinder sind nur zu einer abgeschwächten humoralen Immunantwort fähig und ihre zellvermittelte Immunantwort, also ihre Abwehrfähigkeit gegenüber Impfstoffen und Masernvirus, ebenso wie gegenüber BCG-Impfstoff oder Tuberkelbakterien fehlt völlig.

Die von Bruton 1952 beschriebene Agammaglobulinämie befällt nur Knaben (x-chromosomal vererbt) und beruht auf einem Ausreifungsdefekt der B-Zellreihe, mit normaler Anzahl unreifer B-Zellen im Knochenmark, aber fehlenden reifen zirkulierenden B-Zellen mit Oberflächenimmunglobulinen.

Der Mangel an Immunglobulinen führt zu rezidivierenden Infekten mit pyogenen Bakterien (Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes, Neisseria meningitidis und haemophilus influenza).

Diese klinischen Beobachtungen und in vitro-Experimente führten zu der Theorie der undifferenzierten hämatopoetisch-lymphopoetischen Stammzelle, die während der Embryogenese in den Thymus und bei den Vögeln in die Bursa Fabricii, bei den Säugern in eines oder mehrere nicht morphologisch definierte Organe einwandert und dort

beeinflußt durch spezifisch lösliche (Bach J.F. 1976) und zelluläre Umgebungsfaktoren und -signale (Bhan 1980, Reinherz 1980) zu immunkompetenten Zellen mit ihren unterschiedlichen Aufgaben und der Fähigkeit der (Fremd-)antigenerkennung heranreifen.

Die lichtmikroskopisch nicht unterscheidbaren T- und B-Lymphozyten konnten 1970 von Raff durch den Nachweis des für die T-Lymphozyten von Mäusen spezifischen Theta-isoantigen und dem Oberflächen-Immunglobulinnachweis auf den B-Zellen mittels der Immunfluoreszenztechnik im peripheren Blut und lymphatischen Organen (Thymus, Lymphknoten, Milz und Ductus thoracicus) von Mäusen differenziert werden.

Diese inzwischen klassische Arbeit der Immunologie war richtungsweisend für weitere detaillierte Bestimmungen und Nachweismethoden in der Erforschung der an den unterschiedlichen immunologischen Vorgängen bei Mensch und Tier beteiligten lymphozytären Subpopulationen.

Mit dem von Jondal und Wigzell 1973 standardisierten Rosettentest wurde eine Klassifikation auch der menschlichen Lymphozyten in T- und B-Zellen ermöglicht.

Nachdem gezeigt worden war, daß von den menschlichen Lymphozyten ausschließlich diejenigen unter bestimmten experimentellen Bedingungen Schaferythrozyten rosettenförmig binden, auf denen

1. kein Oberflächenimmunglobulin nachweisbar war;

2. die ausschließlich die thymusabhängigen paracorticalen Lymphknotenareale be-

siedeln und

3. in denen ein thymusabhängiges Antigen HTL (Yata 1973) nachweisbar ist,

wurde dieser Test zur quantitativen Bestimmung der T-Lymphozyten beim Menschen angewandt. Die menschlichen B-Zellen wurden wie bei den Mäusen durch den Nachweis von Oberflächenimmunglobulin charakterisiert.

Der technisch aufwendige und zudem sehr störanfällige Rosettentest wurde vielfältig modifiziert, so daß auch die Klassifikation funktionell verschiedener T-Zellsubpopulationen durch den Nachweis von Fc-Rezeptoren spezifisch für unterschiedliche Immunglobulinklassen mit denen die Indikatorerythrozyten beschichtet worden waren, gelang (Merill 1980).

Mit der Entwicklung der Hybridomazelltechnik zur Gewinnung monoklonaler hochspezifischer Antikörper (Köhler und Milstein 1975), wurde der Nachweis dieser T-Suppressorzellen als auch von T-Helferzellen, die die Immunantwort in vivo und in vitro hemmen oder stimulieren, anhand hochspezifischer Oberflächenantigene möglich.

Daß zelluläre Oberflächenantigene mit bestimmten Aufgaben der Zellen bei den immunologischen Prozessen gekoppelt sind, konnte durch zahlreiche Auftrennungsverfahren und in vitro zelluläre Funktionstests gezeigt werden (Reinherz, Kung, Goldstein und Schlossman 1979, Reinherz und Kung 1980, Reinherz 1982).

Die genauen Mechanismen der Kooperation zwischen den verschiedenen zellulären Subpopulationen bei der Immun-

antwort sind noch nicht bekannt (Kölsch 1984).

Gesichert scheint zu sein, daß ein Fremdantigen den T-Helferzellen in geeigneter Form von den Makrophagen, gekoppelt mit dem selbstspezifischen HLA-Antigen präsentiert werden muß, so daß diese den lymphozytären mitogenen Helferfaktor produzieren können, der T-, B- und O-Zellen zur Proliferation anregt (Reinherz et al. 1980).

Die so unspezifisch aktivierten B-Zellen sind nun in der Lage, das antigene Hapten zu erkennen und die Zellen, die genetisch bedingt für dieses Antigen spezifische Immunglobulin produzieren können, reifen zu Immunglobulin produzierenden Plasmazellen heran.

Der T-Zellrezeptor, der genetisch codiert ist, erkennt Fremdantigen nur in Verbindung mit HLA codierten für das Individuum spezifische Oberflächenantigene. Nach Antigenerkennung werden lösliche Mitogene oder Lymphozytenhemmende Faktoren gebildet. Ein Teil der T 8+ / T 5+ werden direkt zytotoxisch, wobei noch unklar ist, ob alle T 8+ / T 5+ Zellen diese Möglichkeit haben, oder ob nur eine eventuell genetisch definierte Subpopulation die Möglichkeit hat zur zytotoxischen Effektorzelle auszudifferenzieren.

Zur Erklärung der erstaunlichen Fähigkeit der immunkompetenten Zellen des Immunsystems durch Fremdantigen zu einer humoralen oder zellulären Immunantwort stimuliert zu werden bei gleichzeitiger Toleranz gegenüber den antigen wirksamen Substanzen des eigenen Selbst, hatte Burnet 1958 die Theorie der bereits prä-

natal induzierten klonalen Selektion der potentiell autoreaktiven und damit "forbidden clones" entwickelt.

Diese Theorie wurde gestützt durch die Beobachtungen von Owen 1945 an dizygoten Zwillingskälbern mit gemeinsamer placentarer Zirkulation, die im späteren Leben keine Abstoßungsreaktion auf gegenseitig transferierte Erythrozyten oder andere Gewebezellen zeigten.

Medawar gewann den Nobelpreis für seine Experimente, in denen er zeigte, daß Mäuse, die man bereits pränatal, in utero, fremden Histokompatibilitätsantigenen aussetzte, im späteren Leben diesen Antigenen gegenüber tolerant waren.

Mit der Entdeckung der T-Suppressorzellen (Gershon 1980, Möller 1975) und dem Erkennen der Existenz autoimmunologischer Erkrankungen, bei denen autoreaktive "forbidden clones" erstens existieren und zweitens tatsächlich gegen körpereigene Strukturen aktiv werden, gewann das von Jerne 1970 entwickelte Modell der idiotypischen-antiidiotypischen Netzwerkregulation des Immunsystems, bei welchem, so die Vorstellung, die autoreaktiven Zellklone durch Suppressorzellen in ihrer Aktivität gehemmt werden, zunehmend an Bedeutung.

Diese Hemmung der autoreaktiven Zellen wird durch direkten zellulären Kontakt oder indirekt durch von den Suppressorzellen produzierte lösliche Faktoren den Lymphokinen vermittelt.

Diese auf aktive Hemmung beruhende Selbsttoleranz wird bei den autoimmunologischen Erkrankungen durchbrochen

(Reinherz und Schlossman 1980, Bach, M.A. 1981).

Dabei scheinen genetische, virale und hormonelle Faktoren auf im Detail noch nicht bekannten Wegen eine den Krankheitsprozeß auslösende oder unterhaltende Rolle zu spielen. Eine quantitative Reduktion der T-Suppressorzellen unter Umständen mit Nachweis eines Antikörpers gegen die T-Suppressorzell-Population wie bei der jugendlichen rheumatoiden Arthritis (Strelkauskas et al. 1978), oder ein qualitativer Defekt der T-Suppressorzellaktivität in vitro Funktionstests bei Multipler Sklerose (Antel 1979, Reinherz 1980, Merill 1982 und 1984), stützt die Hypothese des T-Suppressorzelldefektes (quantitativ oder qualitativ) mit enthemmter Aktivität der autoreaktiven Zellklone bei den primär autoimmunologischen Erkrankungen.

Unter autoimmunologischen Erkrankungen versteht man Zustände, bei denen primär ohne vorhergehende Gewebeläsion Autoantikörper gebildet werden, die dann sekundär zu Gewebeläsionen führen.

Die präzise pathogenetische Bedeutung der "T-Zelldefekte" ist jedoch noch unklar, zumal sie nicht bei allen Patienten mit autoimmunologischen Erkrankungen gefunden werden (Miller und Schwartz 1979).

Dies gilt sowohl für die autoimmunologischen Erkrankungen aus dem Bereich der Inneren Medizin, als auch für die Erkrankungen des zentralen und peripheren Nervensystems mit Verdacht auf autoimmunologische Pathogenese wie bei der Multiplen Sklerose, der Polyradiculitis, Guillain-Barré-Strohl und der subakuten sklerosierenden Panencephalitis (Weiner und Hafler 1984).

DARLEGUNG DER AUFGABENSTELLUNG

Seit es Coons und Mitarbeitern 1942 erstmals gelang, Antikörper an Fluorchrome zu koppeln (nämlich an das auch heute noch am häufigsten verwandte Fluoresceinderivat das Fluoresceinisothiocyanat = FITC) und Möller 1961 den Nachweis von Oberflächenantigene auf lebenden Zellen mit Hilfe der Membranimmunfluoreszenz erbrachte, sind unterschiedlich modifizierte Immunfluoreszenstechniken heute aus der klinisch-immunologischen Diagnostik, der pathologisch-histologischen Zelltypisierung und der immunologischen Grundlagenforschung nicht mehr wegzudenken.

Vereinfacht dargestellt beruhen die Immunfluoreszenztechniken darauf, daß die an Antikörper gekoppelte Fluorchrome durch auf eine bestimmte Wellenlänge gefiltertes Licht (Erregerfilter) in einen energetisch angeregten Zustand versetzt werden. Für die Grünfluoreszenz von FITC ist dies Blaulicht mit einer Wellenlänge von 495 nm.

Die bei Exzitation absorbierte Energie wird in Form von langwelligerem, energieärmerem Licht wieder abgegeben und nur dieses vom Fluorochrom emittierte Licht einer bestimmten Wellenlänge gelangt nach Passage eines weiteren Filters (Sperrfilter) z.B. als grünfluoreszierendes Licht in das Okular des Fluoreszenzmikroskops.

Die Anwendung monoklonaler Antikörper in Kombination mit der Immunfluoreszenz-Sandwichtechnik wird bei der Diagnostik neoplastischer Erkrankungen des lymphatischen und hämatologischen Systems, sowie bei Erkrankungen mit Immundefekten, und bei der HLA-Typisierung vor Organ-

transplantationen routinemäßig durchgeführt. Mit der weiten Verbreitung dieser bewährten und standardisierten immunologischen Nachweistechniken entstand jedoch bald das Bedürfnis, die Nachteile dieser Methode, die im folgenden aufgezählt sind, auszugleichen:

1. Die fluoreszierende Markierung ist nur flüchtig nachweisbar, was eine Nachuntersuchung durch denselben oder einen anderen Untersucher häufig unmöglich macht, darüber hinaus die Dokumentation und die Demonstration zu Lehrzwecken erschwert.

2. Ist eine morphologisch-zytologische Beurteilung, wie sie besonders bei neoplastischen Zellsedimenten von Bedeutung werden kann oder zum Ausschluß unspezifisch mitreagierender Monocyten und Granulozyten im Phasenkontrast-Mikroskop nur eingeschränkt möglich.

3. Sind sowohl die Anschaffungskosten des Fluoreszenz-Mikroskops als auch Unterhaltungskosten der Methodik, die an jeder frisch eingehenden Probe möglichst bald durchgeführt werden muß, auch in der Routineanwendung relativ hoch.

4. Ist eine hohe Antigen / Zellkonzentration in der Frischzellsuspension von ca. 1-2 x 10^7 / Zellen / ml nötig (Wick und Schauenstein 1983), da es während der Markierungsprozedur unter anderem durch die zahlreichen Waschschritte zu hohen Zellverlusten kommt.

Es ist keine Schwierigkeit, mit dem von Böyum 1968 entwickelten Verfahren der Zellauftrennung aus nur 10 ml peripherem Blut eine zur immunologischen Typisierung ausreichende Zellmenge zu gewinnen.

Bei Liquoruntersuchungen hingegen stehen je nach Zellgehalt und Probenmenge nur zwischen 2.000 und 20.000 Zellen zur Verfügung. Bei lymphozytären Pleozytosen max. 5 Mill. Zellen, gerade die Zellmenge, die einem Milliliter Blut entspricht (Stark 1985).

Größere Zellverluste bei der Zellgewinnung und während der Markierungsprozedur selbst sind bei den immunologischen Typisierungstechniken von Liquorzellen deshalb nicht zu tolerieren.

Eine Möglichkeit zur Lösung dieser Probleme zeichnete sich durch die Entwicklung der immunenzymatischen Nachweistechniken ab. Nakane und Pierce koppelten 1966 erstmals das Enzym Meerettichperoxidase an Hyperimmunglobuline und Avrameas wendete diese enzymgekoppelten Reagenzien auf histologischen Schnitten an.

Diese Immunenzymatische Technik zum Nachweis zellulärer Antigene bietet gegenüber der Immunfluoreszenz folgende Vorteile:

1. Der wasserunlösliche Niederschlag, der bei der Peroxidase katalysierten Nachweisreaktion am Ort der Antigen-Antikörperbindung ausfällt, ist lichtmikroskopisch nachweisbar und bleicht auch über Monate hin nicht aus.

2. Gleichzeitig mit der Beurteilung der immunologischen Markierung ist die Zellmorphologie auch von Liquorzellen in Abhängigkeit von der Güte der Technik der Zellgewinnung und einer schonenden Fixation exzellent beurteilbar und den hämatologisch zytologischen Routinefärbungen wie z.B. nach Pappenheim u.a. ebenbürtig.

3. Können die immunenzymatischen Nachweismethoden gut auf tiefgefrorenen Schnitten oder schonend fixiertem Gewebe und Zellsedimente angewendet werden, wodurch die Technik rationell und kostensparend eingesetzt werden kann.

4. Ist die Zellkonzentration aus zellarmen Körperflüssigkeiten wie Aszites, Pleuraergüssen oder besonders auch von Liquor ausschließlich abhängig vom Modus der Zellgewinnung und Konzentrierung, da es während der immunologischen Markierungsprozedur selbst zu keinen weiteren nennenswerten Zellverlusten oder Zellveränderungen kommt.

Wegen des Vorteils eines lichtmikroskopischen Nachweises immunologischer Markierung bei gleichzeitiger Betrachtung der Zellmorphologie, was unter anderem eine Beurteilung unspezifischer Markierung besonders von Monozyten und Granulozyten durch Bindung des Fc-Fragments monoklonaler und sekundärer Antikörper an Fc-Rezeptoren erlaubt, fanden diese Methoden breite Anwendung in der pathologischen Diagnostik besonders von Tumoren (Taylor 1978; Stemberger 1979; Mason 1980).

Als Nachteil der immunenzymatischen Markierungsmethoden wird von einigen Autoren der höhere Zeitaufwand infolge der häufigeren Inkubationsschritte als bei der Immunfluoreszenz (= IF) angeführt.

Dem steht entgegen, daß die IF in der hämatologischen Diagnostik überwiegend an frischen Proben durchgeführt wird, wohingegen die immunenzymatischen Markierungstechniken, an fixierten und tiefgefroren aufbewahrten Zellsedimenten angewandt werden können, so daß mehr Proben mit weniger Zeit und Materialaufwand ratio-

neller und kostensparender als mit der Immunfluoreszenz markiert werden können.

Bei Anwendung der IF wurden schon wiederholt über die automatisierte quantitative Auswertung der IF-Intensität berichtet (Reder , 1984).
Ergebnisse über quantitative Auswertung der Immunperoxidase-Markierung liegen derzeit noch nicht vor, so daß bei Fragestellungen nach der quantitativen immunologischen Markierungsintensität pro Zelle die IF-Techniken derzeit weiterhin Vorrang haben.

Einerseits die methodisch bedingte besonders hohe Antigenkonzentration, andererseits die besondere Vulnerabilität der Liquorzellen gegenüber mechanischen, chemischen und thermischen Einflüssen post punctionem haben eine routinemäßige Anwendung der Immunfluoreszenz-Techniken zum Nachweis zellulärer Antigene im Liquor verhindert.

Panitch wendete 1982 eine direkte IF-Technik zur Bestimmung der T 4:T 8 Ratio im peripheren Blut und Liquor von an Multipler Sklerose Erkrankten an. Er entnahm 15 - 30 ml Liquor bei einer Zellzahl von 1 - 6 / mcl (entspricht 3-18/3), die Markierungsprozedur selbst dauerte 1 h.

Hohlfeld und Mitarbeiter stellten 1983 eine doppelte Sandwich-IF-Technik mit drei Inkubations- und sieben Waschschritten vor, die 160 Minuten dauerte und nur bei Pleozytosen mit mehr als 10 Zellen / mm^3 (= 30/3 Zellen/mcl) zu quantitativ auswertbaren Zellbildern führte.

Diese Methode ermöglichte nicht eine quantitative Bestimmung der immunologisch definierten Subpopulationen in normozytären Liquores. Es ist zu bedenken, daß selbst Liquores mit Infiltrationen neoplastischer Lymphomzellen quantitativ normalzellig (16/3 mcl entspricht 5.000 Zellen/ml) sein können. Auch Liquores von Multiple Sklerose-Patienten sind in 40 % der Fälle quantitativ normalzellig (Sayk 1960, Tourtelotte 1979), was jedoch nicht ausschließt, daß pathogenetisch bedeutsame quantitative und qualitative Veränderungen der immunologisch definierten Subpopulationen vorliegen können (Steck 1984).

Aus diesem Grund ist es nötig, eine Methode zur immunologischen Lymphozytentypisierung im Liquor zu etablieren, die auch an normalzelligen Liquores anwendbar ist.

Zudem ist zu berücksichtigen, daß die Zellen durch ihren Aufenthalt in dem für sie ungünstigeren chemischen Milieu des Liquors bereits eine vita minima durchgemacht haben, so daß sie post punctionem äußerst rasch mit nekrobiotischen Veränderungen auf chemische, thermische und mechanische Einflüsse reagieren. Schon bei der Darstellung der Zellen in der routinemäßig angefertigten Pappenheimfärbung steigt der Anteil der nekrotischen Zellen bei der Anfertigung der Präparate nach mehr als 30 Minuten post punctionem steil an und die Anfärbbarkeit der Zellen wird regellos (Schwarze,1967; Kölmel 1977).

Zum Nachweis zellulärer membranständiger Oberflächenantigene ist es bei dieser besonderen Empfindlichkeit der Zellen deshalb nötig, eine Methode der Zellanreicherung und Zellfixierung anzuwenden, bei der die Zellen so behutsam und so schnell wie möglich post punctionem in ih-

rer in vivo Form dargestellt werden ohne daß die Zelloberfläche oder die Zelloberflächen-Antigene selbst verändert oder zerstört werden.

Auch die weitere Markierungsprozedur selbst sollte die Zelloberflächen weder verändern noch zerstören.

Die Zeit zwischen Liquorentnahme und Zellfixierung sollte so knapp wie möglich gehalten werden.

Dieser Forderung kommen die Anwendbarkeit der immunenzymatischen Markierungsmethoden auf fixierten Zellschnitten oder Sedimenten entgegen (Moir 1983).

Schädlich berichtete bereits 1980 über die Anwendung einer direkten Immunperoxidase-Markierung auf Methanol fixierten Zytozentrifugenpräparaten aus dem Liquor zur Bestimmung Immunglobulinproduzierender B-Zellen bei ätiologisch unterschiedlichen entzündlichen Erkrankungen des ZNS.

Mit einer mehrfach säulenchromato-graphisch gereinigten Peroxidase gekoppelten, gegen menschliches Immunglobulin gerichteten Antikörperlösung konnte er eine gute Spezifität der Peroxidase-Markierung auf den fixierten Zellsedimenten erreichen.

1983 stellte er eine modifizierte indirekte immunenzymatische Markierungsmethode mit Peroxidase-Anti-Peroxidase-Komplex (Graham and Karnovsky 1966) in Kombination mit dem monoklonalen Antikörper OKT 8 auf Methanol fixierten Zytozentrifugen-Präparate gewonnen aus Liquor und peripherem Blut vor. Bei den nicht entzündlichen Erkrankungen des ZNS ermittelte er im peripheren Blut einen

OKT 8 + Zellanteil von 18 % und im Liquor von 19 %. Bei den viralen Meningitiden fand er einen Anstieg des OKT 8 + Zellanteils im Krankheitsverlauf mit einem Maximum in der 5. Krankheitswoche.

Bei den an Multipler Sklerose Erkrankten lag der mittler Wert der OKT 8+ Zellen im CSF bei 16 % mit einer auffallenden großen Streubreite von 9-21 %.

Früher schon war durch vergleichende Anwendung der Immunperoxidase und der Immunfluoreszenztechniken auf Methanol fixierten Zellsedimenten aus dem peripheren Blut (Kaschka-Dierich 1977), sowie in vitalen Zellsuspensionen (Knowles 1977, Lees 1977, De Cock 1981) gezeigt worden, daß die ermittelten Zellanteile gut miteinander korrelierten (Bellon 1975).

Eine geringe Sensitivität der Immunperoxidase-Technik auf fixierten Zellsedimenten gegenüber der Immunfluoreszenz in Zellsuspension fand sich beim Nachweis zellulärer Oberflächenimmunglobuline von neoplastischen Zelllinien (Mason 1980, Laurent 1982).

Dies wurde auf das als "capping" bezeichnete Phänomen der Konglomeration von eventuell nur in Spuren vorhandenen Membranantigenen durch Vernetzung über die bivalenten Antikörper zurückgeführt, was zu einer "Kappenbildung" an einem Zellpol bei noch vitalen Zellen führt (Taylor 1971).

Die Aufgabe der hier vorliegenden Arbeit war es, aus der Fülle der modifizierten immunologischen Nachweismethoden die bereits an Zellsedimenten aus dem peripheren Blut oder an Gewebeschnitten sich bewährt hatten, eine für die Anwendung an Liquorzellsedimenten geeignete Methode darzustellen.

An die Methode mußten hohe Anforderungen bezüglich der Sensitivität bei Anwendung auf normalzelligen Liquorsedimenten gestellt werden, die andererseits nicht zu ungunsten der Spezifität erkauft wurden. Um den durch langdauernde Markierungsprozeduren bedingten Zellverlust möglichst gering zu halten, sollte die Markierungsprozedur auf fixierten Zellsedimenten durchgeführt werden, die möglichst rasch post punctionem gewonnen werden können und die die Zellen weitestgehend in ihrer in vivo Form darstellen, so daß die immunologisch markierten Zellbilder aus dem Liquor mit denen der Routinefärbung nach Pappenheim gut vergleichbar sind.

Neben diesen Basisforderungen der hohen Sensitivität in antigenarmen, normozytären Liquorproben bei guter Spezifität in antigenreichen Liquor-Pleozytosen und der guten morphologischen Beurteilbarkeit der immunologisch markierten Zellen sollte die Methode die für die Routineanwendung nötigen Bedingungen der einfachen Durchführbarkeit mit einem zeit- und kostenrealistischen Aufwand bei eindeutigen Auswertungskriterien und der guten Dokumentierbarkeit der Ergebnisse erfüllen.

Zuerst wurden zahlreiche zeitraubende Vorversuche durchgeführt, die der empirischen Ermittlung der optimalen Bedingungen für die einzelnen methodischen Schritte dienten.

Von besonderer Bedeutung dabei waren die Wahl der geeigneten Fixationsmethode und der Lagerungsbedingungen der Zellsedimente.

In zahlreichen vergleichenden Versuchsansätzen wurde die optimale Antikörper-Konzentration für die monoklonalen und die sekundären Antikörper, sowie die Art der sekundären Antikörper herausgefunden. Die optimale Inkubationszeit sowohl für die Antikörper-Reagenzien als auch für die Peroxidase-Reaktionslösung und die Kerngegenfärbung wurde ermittelt sowie die Zusammensetzung der Verdünnungs- und Spülpuffer.

Nachdem sich die im methodischen Teil ausführlich dargestellte Technik der doppelten indirekten Immunperoxidase-Markierung als optimal herauskristallisiert hatte, wurde sie in der Routineanwendung an nicht selektionierten Liquorproben, die mit unterschiedlicher klinischer Fragestellung in ausreichender Menge ins Liquorlabor gesandt worden waren, erprobt.

So konnten von 39 Patienten die erforderlichen Zellsedimente angefertigt und der Anteil der nach ihren Oberflächenmarkern definierten Subpopulation der OKT 4+ Helfer- und OKT 8+ Suppressorlymphozyten quantitativ bestimmt werden. Davon waren sieben Proben von neurologisch und internistisch gesunden Patienten, zehn von Patienten mit bakteriellen, viralen und ätiologisch anderen entzündlichen Erkrankungen (außer Multiple Sklerose) des ZNS.

16 Patienten waren im akuten Schub einer Multiplen Sklerose, erstmals oder rezidivierend erkrankt. Proben von Patienten in Remission einer MS-Erkrankung lagen nicht vor. Sechs Proben konnten von Patienten mit nicht entzündlichen Erkrankungen des ZNS (Hirntumoren, Hydrocephalus, Meningocele, ZNS-Metastasen) gewonnen werden. Keiner der Patienten erhielt zur Zeit der Liquorgewinnung Glucocorticoide oder Immunsuppressiva.

Besonders interessierte bei der Anwendung der Immunperoxidase-Markierung zur Bestimmung der T 4 : T 8 Ratio im Liquor der Anteil der OKT 4+ Helferlymphozyten und der Anteil der OKT 8+ Suppressor-Lymphozyten bei Patienten im klinisch aktiven Stadium einer MS-Erkrankung im Vergleich zu der T 4 : T 8 Ratio bei anderen entzündlichen Prozessen des ZNS oder der Kontrollgruppe der neurologisch und internistisch gesunden Patienten und der Patienten mit nicht entzündlichen Erkrankungen des Zentralnervensystems.

Bei Anwendung monoklonaler Antikörper und der Immunfluoreszenztechnik zur quantitativen Bestimmung der regulatorisch für bedeutsam gehaltenen T-Zellsubpopulationen im peripheren Blut und Liquor von an Multipler Sklerose Erkrankten wurden in den letzten Jahren widersprüchliche Ergebnisse veröffentlicht.

Panitch 1982 berichtete über eine Reduktion des T 8+-Zellanteils im peripheren Blut und Liquor von Patienten mit einer chronisch progressiven Verlaufsform der Multiplen Sklerose.

Steck und de Flangergues 1984 fanden eine erhöhte Leu 3a (OKT 4) zu Leu 2a (OKT 8) Ratio im peripheren Blut sowohl bei chronisch progredienten, als auch bei akut

rezidivierenden Verlaufsformen der Multiplen Sklerose.

Interessanterweise fanden sie keine Korrelation der Leu 3 : Leu 2a Ratio im peripheren Blut zu entzündlichen Parametern wie Immunglobulin-Erhöhung und Zellzahlerhöhung im Liquor.

Cashman ermittelte 1982 einen T-Suppressorzellverlust im Liquor im akuten Krankheitsstadium und fand interessanterweise bei intraindividuellen Verlaufskontrollen einen überschießenden T-Suppressor-Zellanteil in der dritten Krankheitswoche. Er wies ebenfalls auf die fehlende Korrelation der T 4 : T 8 Ratio zur Zellzahlerhöhung im Liquor hin.

Bach M.A. fand 1985 ein erhöhtes T 4 : T 8 - Verhältnis im peripheren Blut von Patienten im Rezidiv, was jedoch nur bei der Hälfte der Patienten gegenüber gesunden Kontrollen auf dem 5 %-Niveau signifikant war.

Hauser und Weiner hatten 1982 als eine der ersten darauf hingewiesen, daß die Veränderungen der T 4 : T 8 Ratio im peripheren Blut bei MS-Kranken unspezifisches Epiphänomen darstellen könnten.

Kastrukoff zeigte 1984, daß bei der Multiplen Sklerose klinische Krankheitsaktivität nicht streng mit einer T 8+-Suppressorzell-Reduktion im peripheren Blut korreliert ist. Er fand sowohl ein erhöhtes T 4 : T 8 Verhältnis im peripheren Blut von Patienten, ohne klinische Aktivitätszeichen als auch eine normale T 4 : T 8 Ratio bei Patienten mit klinisch aktivem Krankheitsstadium.

Auch Rice et al. wies 1984 auf fehlende Korrelation des T 8+ / T 5+-Zytotoxischen Suppressorzellanteils im peripheren Blut zum klinischen Aktivitätsstadium der Multiplen Sklerose hin.

Aufgrund dieser kontroversen Ergebnisse bei der Bestimmung der T4+-Helfer und der T 8+-Suppressorzellen im peripheren Blut bei Patienten mit Multipler Sklerose in unterschiedlichen Krankheitsstadien wurde in der hier vorliegenden Arbeit die T 4+-Helfer und die T 8+-Suppressorzellen im Liquor von Patienten im klinisch aktiven Krankheitsstadium bestimmt.

Als klinisch aktiv wurden die Multiple Sklerose-Kranken definiert, die bis zu einem Zeitraum von einer Woche vor der Lumbalpunktion neue, neurologische Defizite entwickelt hatten.

Es sollte untersucht werden, ob bei der quantitativen Ermittlung der T 4+-Helfer und der T 8+-Suppressorzellanteile im Liquor von Patienten im klinisch aktiven Krankheitsstadium sich im Gegensatz zu den Befunden aus dem peripheren Blut immer ein T-Suppressorzellverlust nachweisen läßt, oder ob sich die im peripheren Blut gefundene Heterogenität der T 4 : T 8 Ratio bei der klinisch aktiven Multiplen Sklerose auch bei Untersuchungen im Liquor bestätigen läßt.

Da bereits Sayk 1960 darauf hingewiesen hatte, daß man nur bei ca. 60 % der Multiple Sklerose-Patienten pleozytären Liquor gewinnt, erschien es sinnvoll, die Gruppe der MS-Liquores in die Untergruppen der normozytären (weniger oder gleich 16/3 Zellen) und der pleozytären Proben (mehr als 16/3 Zellen) einzuteilen und zu un-

tersuchen, ob diese Einteilung eine Korrelation zu immunologischen, zytologischen oder chemischen Parametern im Liquor zuläßt.

Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob eine Korrelation zwischen immunologisch-zytologischen Befunden im Liquor zu anderen in der Routinediagnostik bestimmten liquorzytologischen oder liquorchemischen Parametern besteht.

Zum Nachweis der zellulären Oberflächenantigene wurde eine im methodischen Teil der Arbeit ausführlich dargestellte doppelte indirekte Immunperoxidase-Nachweistechnik auf durch Spontan-Sedimentation in einer modifizierten Saykschen Kammer gewonnenen Liquorzellsedimenten angewandt.

Diese Immunenzymatische Nachweistechnik, durchgeführt auf luftfixierten, gefroren aufbewahrten Liquorzellsedimenten trägt einerseits der besonderen Fragilität der Liquorzellen gegenüber chemischen und mechanischen Einflüssen post punctionem Rechnung und ermöglicht andererseits eine gut reproduzierbare und verläßliche quantitative Auswertung der immunologisch markierten Liquorzellen sowohl in pleozytären als auch in zellarmen Liquorproben (Schädlich 1983; Moir 1983; Stark 1985).

Die Ergebnisse der Anwendung dieser Technik zur Ermittlung der T 4 : T 8 Ratio in Liquores von neurologisch und internistisch gesunden Probanden, von an klinisch aktiver Multiple Sklerose erkrankten Patienten, von Patienten mit viralen und bakteriellen Meningitiden, sowie anderen entzündlichen und nicht entzündlichen Erkrankungen des Zentralnervensystems werden dargestellt.

Material und Methode

Material

Die im methodischen Teil dieser Arbeit ausführlich dargestellte doppelte indirekte Immunperoxidase-Markierungstechnik wurde von August 1984 bis Januar 1985 auf nicht ausgewählten Liquorzellsedimenten angewandt, die aus Liquores gewonnen werden konnten, die mit unterschiedlicher klinischer Fragestellung in ausreichender Menge zur liquorzytologischen und liquorchemischen Routinediagnostik in das Liquorlabor gesandt worden waren.

Unmittelbar nach der Zellzählung in der Fuchs-Rosenthalkammer wurden zusätzlich zu dem routinemäßig angefertigten Zellsediment für die panoptische Färbung nach Pappenheim zur morphologischen Liquorzelldiagnostik weitere Zellsedimente aus dem frischen, nativen Liquor zur immunologischen Zelltypisierung in der später detailliert beschriebenen Saykschen Kammer gewonnen.

So konnten von 39 Patienten die erforderlichen Zellsedimente angefertigt werden.

Davon waren 16 Patienten klinisch im akuten Stadium einer Multiplen Sklerose, erstmals oder rezidivierend erkrankt. Als klinisch aktiv wurden die Multiple Sklerose Patienten definiert, die bis zu einer Woche vor der Liquorgewinnung neue neurologische Defizite entwickelt hatten. Proben von Patienten in Remission lagen nicht vor. Keiner der Patienten erhielt zur Zeit der Lumbalpunktion Glucocorticoide oder Immunsuprressiva.

Da bereits Sayk 1960 darauf hingewiesen hatte, daß nur bei ca. 60 % der Multiple-Sklerose-Patienten eine Liquor-Pleozytose vorliegt, wurden die Proben von an klinisch aktiver MS-Erkrankten in die Untergruppen der normozytären MS-Proben (mit weniger oder gleich 16/3 Zellen) und der pleozytären Proben (mit mehr als 16/3 Zellen) eingeteilt.

Von drei Patienten mit viralen und von drei Patienten mit bakteriellen Meningitiden konnten ebenfalls die zur immunologischen Typisierung erforderlichen Zellsedimente gewonnen werden.

Es liegen vier Proben von Patienten vor, die an ätiologisch ungeklärten chronisch entzündlichen Prozessen des ZNS mit lymphozytärer Liquor-Pleozytose und/oder Zeichen der lymphozytären Proliferation einhergingen (klinisch keine Multiple Sklerose).

Von drei Patienten mit Hirntumor, einer Patientin mit Hirnmetastasen eines Mammacarcinoms, von einem Patienten mit Hydrocephalus und einem Kind mit einer Meningocele, mit oder ohne Fremdkörperreizpleozytose wurden ebenfalls zusätzliche Sedimente zur immunologischen Zelltypisierung angefertigt.

Diese Patientengruppen mit entzündlichen und nicht entzündlichen Erkrankungen des ZNS bildeten die Vergleichsgruppen gegenüber den Proben von an klinisch aktiver Multipler Sklerose erkrankten Patienten.

Von sieben Patienten mit funktionellen Beschwerden, die neurologisch und internistisch ohne pathologischen Be-

fund waren, bei denen zum Ausschluß einer chronisch Encephalitis eine Lumbalpunktion durchgeführt wurde, konnte liquorzytologisch und liquorchemisch unauffälliger Liquor gewonnen werden. Proben dieser Patienten bildeten das Normalkollektiv für die immunologische Lymphozytentypisierung.

Methode der Zellgewinnung durch Spontansedimentation in einer modifizierten Saykschen Kammer

Unmittelbar nach der Liquorentnahme und der Zellzählung in der Fuchs-Rosenthalkammer wurden von jedem Liquor, der zu einer der Probengruppe gehörte, außer dem Routinesediment für die panoptische Färbung nach Pappenheim zur morphologischen Zelldifferenzierung zusätzliche Sedimente durch Spontansedimentation des frischen, nativen Liquors in der nach Kölmel 1978 modifizierten Saykschen Kammer für die immunologische Markierung angefertigt.

In dieser modifizierten Saykschen Kammer (siehe Abb. 1) ist die Sedimentationsgeschwindigkeit der Zellen auf den durch Alkohol entfetteten Objektträger abhängig von dem Druck der Liquorkammer auf den Objektträger und von der kapillären Sogwirkung des Fließpapiers selbst.

Der Fließpapierstreifen ist unter Aussparung einer im Durchmesser 1 cm großen runden Sedimentationsfläche zwischen dem liquorhaltigen Plastikzylinder (= Liquorkammer) und dem Objektträger, der den Boden der Kammer bildet, durch Schraubendruck, der über eine Feder verti-

kal auf die Kammer übertragen wird, fest eingespannt.

Der Zylinderdruck auf den Kammerboden wird also durch den Schraubendruck beidseits der Kammer, der über eine Stahlfeder auf die Kammer übertragen wird, reguliert.

Die Spontansedimentation der Liquorzellen auf den Objektträger wird durch die kapilläre Sogwirkung des Fließpapierstreifens beschleunigt.

Durch die Sogwirkung, die in ihrer Intensität abhängig ist vom Kammerdruck auf den Objektträger und von der faserigen Beschaffenheit des Fließpapiers, strömt Liquor in den Fließpapierstreifen ab und eine ausreichende Anzahl morphologisch exzellent erhaltener Zellen auch bei zellarmen Proben gelangt zur Sedimentation auf den Objektträger, der den Kammerboden bildet.

Die Anzahl der Zellsedimente, die aus einer Liquorprobe mit dieser Technik gewonnen werden können, ist abhängig von der Probenmenge und von der Zellkonzentration in der Probe.

Die Zellzahl wurde sofort nach Eingang des Liquors in das Labor in der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer ermittelt.

Bei normalzelligem Liquor wird der Schraubendruck so fest angezogen, daß 1000 mcl Liquor während 20 Minuten abströmt, eine Zeit, in der bei frischem Liquor nur vereinzelt autolytische Zellen gesehen werden.

Bei Proben mit mehr als 100/3 Zellen (30.000 / ml) bis zu 500/3 (150.000 / ml) werden nur 500 mcl über die gleiche Zeit sedimentiert. Der Schraubendruck muß also

fester angezogen werden, so daß die Geschwindigkeit des Liquorabflusses gedrosselt wird.

Bei massiven Pleozytosen mit mehr als 1000/3 Zellen (300.000 / ml) werden nur 300 mcl oder sogar noch weniger zur Sedimentation gebracht.

Das Bestreben ist, die Sedimentationszeit konstant zu halten. Bei längerer Sedimentationszeit steigt der Anteil der autolytischen Zellen exponentiell an, bei kürzerer Sedimentationszeit steigt der Zellverlust in das umgebende Fließpapier, da die Geschwindigkeit des abfließenden Liquors größer wird.

Die Liquormenge, die zur Gewinnung gut auswertbarer Zellsedimente bei unterschiedlich zellreichen Liquores führt, muß also für jeden Typ von Saykscher Kammer und verwendetem Fließpapier standardisiert werden.

Methode der Liquor-Zellgewinnung durch Zytozentrifugation

Bei der in dieser Arbeit verwendeten elektrischen Zytozentrifuge von Shandon können maximal 12 Plastikküvetten mit Liquor pro Umlauf in den Zentrifugenkopf eingehängt werden. In die Küvetten können zwischen 0.2 ml bis max. 2 ml Liquor eingefüllt werden.

Das Fließpapier wird wie bei der Spontansedimentation in der modifizierten Saykschen Kammer, unter Aussparung einer im Durchmesser 6 mm großen kreisrunden Sedimentationsfläche zwischen der liquorhaltigen Plastikküvet-

te (= Liquorkammer) und dem entfetteten Objektträger mittels Küvettenclips fest eingespannt.

Da das Fließpapier max. 0,7 ml Flüssigkeit aufsaugen kann (Wurster 1984), werden beim Einsatz von 200 - 400 mcl Liquor optimal auswertbare Zellbilder erhalten.

Bei der Gewinnung der Liquorzellsedimente darf die Umdrehungsgeschwindigkeit 800 U /min. nicht überschreiten. Die Zentrifugationsdauer betrug 10 min.

Übersicht über die verwendeten Reagenzien zur immunzytologischen Markierungstechnik

		Bezugsquelle
Monoclonale Antikörper	OKT 3, OKT 4, OKT 8, OKT 6, OKT 10, TQ 1;	Coulter Electronics
	B1, B4 Ia	New Engl. Nuclear
	Mausimmunglobuline als Kontrollserum	Coulter Electronics
Sekundärer Antikörper	Peroxidase konjugierte Kaninchenantikörper gegen Mausimmunglobuline	
	Peroxidase konjugierte Schweinantikörper gegen Kaninchenimmunglobuline	Dakoppats A/S
Puffer	Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)	Biochrom KG
	bovines Serumalbumin (BSA)	Schering
	fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom
Histochemische Reagenzien	3,3' Diamino-Benzidin-Tetrahydrochlorid; reinst	Serva
	3 % Wasserstoffperoxyd (H_2O_2)	
	saures Haematoxylin	Merck
	Eindeckmittel Glyzerin-gelatine (Vitroglud)	

Methode des immunzytologischen Antigennachweises mittels der Immunperoxidase-Sandwichtechnik auf Liquorzellsedimenten:

Nach der Sedimentation wurden die Zellen 30 Minuten luftgetrocknet, in Aluminiumfolge eingewickelt luft- und lichtgeschützt bei -30 Grad Celsius gelagert. Auch bei Lagerung über mehrere Wochen wurde kein Antigenverlust beobachtet (Sassen 1980).

Unmittelbar vor der Markierungsprozedur wurden die Zellsedimente aufgetaut und ihre Lokalisation auf dem Objektträger durch Umrundung mit einem Diamantschreiber markiert. Die aufgetauten Zellsedimente wurden 15 Minuten in PBS vorinkubiert und dann in eine feuchte Kammer gelegt.

Zum Nachweis der sich deutlich darstellenden Oberflächenantigene OKT 4, OKT 8, Ia-Antigen wurde eine Antikörperverdünnung von 1 : 80 benutzt.

Bei den nur schwach nachweisbaren Oberflächen-Antigenen T 3, TQ 1, B 1, B 4, T 6, T 10 wurde eine 1:10 verdünnte Antikörperlösung benutzt. Als Kontrollserum wurde 1 : 1 verdünntes Immunglobulin von der Maus benutzt.

Jeweils 20 µl Antikörperstammlösung wurden mit der entsprechenden Menge 10 % FCS, 10 % BSA in PBS verdünnt. Für diese Verdünnungslösung wurden in 800 ml PBS 100 ml BSA auf dem Magnetrührer bei Raumtemperatur gelöst und 100 ml FCS zugegeben. Diese Lösung wurde in 2 ml Portionen eingefroren aufbewahrt.

Die Zellsedimente wurden mit einem dicken Tropfen (100 µl) der verdünnten Antikörperlösung für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Bei dieser Menge wurde kein Austrocknen der Sedimente während der Inkubation beobachtet. Nach jedem Inkubationsschritt erfolgte dreimaliges Waschen der Sedimente in reinem PBS.

Als erster sekundärer Antikörper wurde ein an Peroxidase gekoppeltes Immunglobulin vom Kaninchen, welches mit Immunglobulin von der Maus reagierte, in einer Verdünnung von 1 : 50 in einem dicken Tropfen aufgetragen und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Verdünnungslösung, die auch bei den monoclonalen Antikörpern benutzt wurde, wurde noch 5 % menschliches AB-Serum zur Verdünnung der sekundären Antikörper zugefügt, um unspezifische Bindung abzublocken.

Der zweite sekundäre Antikörper, ein an Peroxidase gekoppeltes Immunglobulin vom Schwein, welches gegen Immunglobuline vom Kaninchen gerichtet war, wurde in der gleichen Konzentration, mit gleicher Inkubationszeit, entsprechend angewendet.

Der Nachweis der durch Antigen-Antikörperreaktionen an die Lymphozyten-Oberflächenantigene gebundene Immunperoxidase erfolgte durch die von der Peroxidase katalysierte Spaltung von Wasserstoffperoxid.
Die dabei freiwerdenden OH^-- und OH^+-Radikale fällten das zugegebene reine Diaminobenzidin zu einem wasserunlöslichen Azofarbstoff, dem Ort der Peroxidaselokalisation, aus.

50 mg Diaminobenzidin, reinst wurden zu Beginn jeder

Markierungsprozedur in 100 ml PBS gegeben und auf dem Magnetrührer unter Lichtabschluß während der ersten drei Stunden der Markierungsprozedur gelöst.

Unmittelbar vor der Inkubation der Zellsedimente mit der Diaminobenzidinlösung wurden dieser 200 µl 3 % Wasserstoffperoxidlösung zugesetzt, und dieses Reaktionsgemisch wurde sofort unter dem Abzug in die Färbewanne mit den Objektträgern filtriert.

Diaminobenzidin gilt als cancerogen und sollte deshalb nicht eingeatmet werden, nicht mit der Haut in Berührung kommen und über die Sondermüllabgabe beseitigt werden.

Die Reaktionslösung wirkte 10 Minuten auf die Zellsedimente ein. Eine Verlängerung der Expositionszeit bringt keine Intensivierung der Markierung, da die Peroxidase durch die entstehenden Peroxidradikale zerstört wird.

Nach der Expositionszeit wurde ausgiebig mit Aqua bidest gespült. Zur Kerngegenfärbung wurden die Objektträger 15 Minuten mit saurem Hämalaun von Merck bedeckt, welches anschließend mit leicht alkalischem Spülpuffer pH 7.4 gründlich entfernt wurde, da bei weiterem Einwirken des Hämalauns besonders bei saurem pH die Kernfärbung wieder abgeschwächt wird.

Die Präparate wurden in flüssiger Glyzeringelatine (Vitroglud) eingedeckt. Sowohl die Markierung als auch die Kernfärbung stellen sich nach einer gewissen "Trocknungszeit" deutlicher dar, weshalb die quantitative Aus-

wertung der Präparate erst am folgenden Tag vorgenommen wurde. Ein Ausbleiben der Kernfärbung oder der Markierung wurde bei den im Dunkeln aufbewahrten Präparaten über einen Zeitraum von einem Jahr nicht beobachtet.

Die Markierung ist in den überwiegend lymphozytären Pleozytosen eindeutig erkennbar. Es wurden mindestens 100 Zellen bei 400-facher Vergrößerung und Ölimmersion ausgezählt.

Der quantitativen Auswertung können unterschiedliche Kriterien zugrunde gelegt werden. Entweder zählt man den Anteil der markierten Lymphozyten im Vergleich zur Gesamtlymphozytenanzahl oder in Bezug zur Gesamtzellzahl.

Die Ermittlung des Anteils der markierten Zellen bezogen auf die Gesamtzellzahl ist technisch wesentlich einfacher und die Schwankungen bei Mehrfachzählungen durch die gleiche Auswertung sind geringer. Deshalb wählte ich die Angabe der markierten Zellen, bezogen auf die Gesamtzellpopulation, wie sie auch bei der Anwendung der Immunfluoreszenztechnik, die ja keine gute morphologische Zelldifferenzierung erlaubt, üblich ist.

Bei diesem Auswertungsmodus fließen jedoch die variablen Anteile der monozytär-granulozytären Zellen mit ein, so daß das Verhältnis der T 4+-Helferzellen zu den T 8+-Suppressorzellen aussagekräftiger ist als die Angabe einer Erhöhung oder Erniedrigung einer der beiden Populationen.

Bestimmung der Albumin- und Immunglobulinkonzentration im Liquor:

Die quantitative Albumin- und Ig G-Bestimmung im Liquor mittels der radialen Immundiffusionstechnik (nach Ouchterlony 1946) ist eine schon seit Jahren in der liquorchemischen Routinediagnostik etablierte Technik, so daß im Rahmen dieser Arbeit die in der Routinediagnostik ermittelten Werte ohne Modifikation der Methode übernommen wurden.

ERGEBNISSE

Ergebnisse der vergleichend eingesetzten Methoden der Zytozentrifugation und Spontansedimentation zur Gewinnung zellulärer Sedimente aus frischem, nativen Liquor

Von fünf frischen (drei normozytären und zwei pleozytären) Liquorproben und von Lymphozytensuspensionen, gewonnen mittels Ficoll-Paque Gradientenzentrifugation (Böyum 1968) aus dem peripheren Blut von fünf gesunden Spendern wurden vergleichend 3-5 Zellsedimente durch Zytozentrifugation in einer elektrischen Zytozentrifuge von Shandon und durch Spontan-Sedimentation in der nach Kölmel 1978 modifizierten Saykschen Kammer gewonnen.

Bei den Zellsedimenten, die mittels der Zytozentrifugation gewonnen worden waren, fiel die sehr unterschiedliche Zelldichte sowohl innerhalb eines Sedimentes als auch im Vergleich der einzelnen Sedimente einer Probe untereinander auf.

Diese quantitativ stark unterschiedliche Zellverteilung fiel besonders bei den normalzelligen Liquorproben ins Gewicht. Es fanden sich Objektträger ohne jeden Zellnachweis und Objektträger mit Zellhaufen, die morphologisch nur eingeschränkt beurteilbar waren.

Bei den zellreichen Proben sowohl von pleozytären Liquores als auch aus dem peripheren Blut fiel die sehr inhomogene Zelldichte pro Gesichtsfeld auf. Dies konnte weder durch Verdünnung der Stammlösung, noch durch Änderung der Umdrehungszahl oder durch unterschiedli-

che Probenmenge zuverlässig reproduzierbar verhindert werden.

Die Gründe für die quantitativ nicht exakt reproduzierbaren Zellbilder bei Anwendung der Zytozentrifuge blieben im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit ungeklärt.

Bei Anwendung der Zytozentrifugation zur Gewinnung von Zellsedimenten aus dem peripheren Blut gewinnen diese Probleme nicht derart an Bedeutung, wie bei Liquorproben. Mit der konzentrierten Lymphozytensuspension aus dem peripheren Blut steht in der Regel genügend Probenmaterial zur Verfügung, so daß aus 10-20 Zytozentrifugenpräparaten diejenigen mit einer standardisiert-angestrebten Zelldichte ausgewählt werden können.

Das Problem eines eventuell selektiven Zellverlustes in das Fließpapier bei der Zytozentrifugation oder durch eine selektive Zerstörung von Zellen, die der Einwirkung der Zentrifugalkräfte gegenüber besonders empfindlich sind, ist noch nicht systematisch untersucht worden.

Bei den Zytozentrifugen-Präparaten sowohl aus dem Liquor als auch aus dem peripheren Blut fiel eine starke Deformierung der Zellen mit zerfranster Oberflächenbegrenzung und vakuolisiertem Zelleib auf.

Darüber hinaus war ihre Anfärbkeit mit der in der liquorzytologischen Routinediagnostik angewendeten Färbetechnik nach Pappenheim regellos intensiviert oder vermindert.

Die Beschickung der Sedimentationskammer mit einer bestimmten Probenmenge in Abhängigkeit von der Zellzahl

der Probe ist in dem liquorzytologischen-liquorchemischen Labor in dem diese Arbeit entstand, bereits seit einigen Jahren, wie im methodischen Teil beschrieben, standardisiert.

Bei Anwendung dieser Probenmenge erhält man ein ausreichend dichtes Zellbild bei normalzelligen Liquorproben (Abb. 3a), aber auch ein noch gut auswertbares bei extrem zellreichen Liquores (Abb. 3b).

Die Adhäsion der Zellen auf dem Objektträger in der Saykschen Kammer ist gleichmäßig verteilt. Bei sehr zellreichen Liquores kommt es bisweilen zur Zellkonzentrierung am Rande des Sediments, ohne daß jedoch dabei eine selektive Anreicherung bestimmter Zellpopulationen beobachtet werden konnte.

Morphologisch und in ihrem Färbeverhalten sind die Liquorzellen, nach Spontansedimentation gut mit den Zellausstrichen, gewonnen aus dem peripheren Blut vergleichbar (Abb. 2).

Sogar zelluläre Details wie Anzahl der Nudeoli, phagozytierte Partikel und Mitosen lassen sich gut erkennen.

Hat man die für die eigene Kammer je nach Zellzahl in der Ausgangsprobe nötige Probenmenge standardisiert erhält man quantitativ und qualitativ gut reproduzierbare, zuverlässig morphologisch optimal beurteilbare Zellbilder, unabhängig vom Eiweißgehalt oder anderen variablen Parametern im Liquor.

Auch die Spontansedimentation von verdünnter Lymphozytensuspension aus dem peripheren Blut von fünf gesunden

Spendern in der Saykschen Kammer ergaben morphologisch gut beurteilbare Zellbilder.

Als Nachteil der Methode stellte sich der Verlust des Liquors in das Fließpapier dar, so daß er nicht mehr für weitere chemische Analysen genutzt werden kann.

Auch berichtete bereits Sayk 1960 über einen Zellverlust von 40 - 60 % durch Abwanderung der Zellen mit dem Flüssigkeitssog in das umliegende Fließpapier. Dies wurde nochmals durch Untersuchungen von Sörnäs 1967 und Schwarze im gleichen Jahr bestätigt, ohne daß sie über einen selektiven Zellverlust oder Zellanreicherung berichtet hätten.

Was gewährleistet sein muß, ist daß der Liquor möglichst rasch post punctionem ins Labor gelangt, da sonst der Anteil der autolytischen Zellen exponentiell ansteigt und es tatsächlich zu einem anfänglich selektiven Verlust der besonders empfindlichen polymorph - kernigen Zellelemente kommt.

Die unterschiedlichen Markierungsmuster beim lichtmikroskopischen Nachweis zellulärer Antigene mittels monoklonaler Antikörper und Immunperoxidase gekoppelten sekundären und tertiären Antikörper:

Das an die sekundären und tertiären Antikörper gekoppelte Enzym Peroxidase katalysiert die Spaltung von Wasserstoffperoxid H_2O_2 zu OH^- und OH^+ - Radikale.

Das entstehende OH^+-Radikal oxidiert das zugegebene Diaminobenzidin zu einem wasserunlöslichen Azofarbstoff,

der am Ort der über Antigen-Antikörperreaktionen zellulär gebundenen Peroxidase als braunschwarzer, körniger Niederschlag ausfällt und lichtmikroskopisch eindeutig identifizierbar ist (Tabelle 5).

Bei dem lichtmikroskopischen Nachweis zellulärer Antigene mit Hilfe der Peroxidase katalysierten Reaktionskette fanden sich keine Unterschiede im Markierungsmuster beim Nachweis der OKT 4-Helferzell-Antigene (siehe Abb. 4) gegenüber den OKT 8-Suppressorzell-Antigenen (vgl. Abb. 5).

Innerhalb einer Zellpopulation jedoch wurden unterschiedliche Markierungstypen gesehen (Abb. 6 und Abb. 7). Die Mehrzahl der großen OKT 4+ und OKT 8+-Lymphozyten zeigen eine die ganze Zelle unter Aussparung des Kerns bedeckende dichte, körnige kräftig goldgelbbraune Markierung, die am Zellrand dunkelbraun betont sein kann (vgl. Abb. 4 und 5).

Die kleinen, in der Pappenheim-Färbung als nacktkernig imponierenden Lymphozyten, zeigen eine dunkelbraune, fast schwarze, breite, fast lineare, wie mit einem dikken Stift gezogene rundum, dicht am Zellkern anliegende Markierungslinie (vgl. Abb. 6, 7 und 8).

Dieser Markierungstyp wird unterschiedlich häufig gefunden, betrug jedoch in keiner der Proben mehr als 10 %. Um zu klären, ob dieser Markierungstyp artifiziell durch lokal hohe Antikörper-Konzentration bedingt ist, wurden unterschiedlich hohe AK-Konzentrationen bis hin zu reinem, unverdünnten Antikörper sowohl der monoklonalen als auch der sekundären Antiimmunglobuline in verschiedenen Versuchsreihen auf die Sedimente einer

Liquorprobe gegeben. Der Anteil der "linear" markierten kleinen Lymphozyten nahm dadurch jedoch nicht zu.

Ein erhöhter Anteil solcher linear markierter Lymphozyten fand sich auch nicht in einer Probe, bei der der Liquor direkt in ein Reagenzglas mit monoklonalen Antikörpern abtropfte und der Liquor erst nach der Inkubation mit den monoklonalen Antikörpern in die Sedimentationskammer gegeben wurde.

Der Nachweis der zellulären T 3-Oberflächenantigene, die charakteristisch für alle peripheren ausgereiften immunkompetenten T-Zellen sind, gelang wesentlich weniger farbintensiv und war nur schwach granulär zellrandständig ausgeprägt.

Auch der Nachweis der B 1 und B 4-Antigene, die auf den ausgereiften, immunkompetenten Zellen der B-Reihe lokalisiert sind, gelang nur bei einem Teil der Präparate so deutlich, wie in Abb. 9 demonstriert, so daß eine quantitative Auswertung mit den in dieser Arbeit verwendeten Reagenzien nicht möglich erschien.

Auch durch Erhöhung der Antikörperkonzentrationen gelang keine Intensivierung des Antigen-Nachweises. Ob dieser quantitativ und qualitativ wenig intensive Nachweis der T 3, B 1, B 4-Antigene im Vergleich zu der intensiven üppigen Darstellung der T 4- und T 8-Antigene Ausdruck einer geringen Dichte der T 3-, B 1-, B 4-Oberflächenantigene ist, konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden.

Die Ia-Antigene gehören zu der Klasse der Major Histokompatibilitäts-Antigene (MHC), Typ II, die nach Antigenstimulation von überwiegend B-Lymphozyten und Mono-

zyten exprimiert werden.
Die Ia+-Zellen sind deutlich zu erkennen. Die Unterscheidung jedoch, ob ein Ia+ großer Lymphozyt oder Monozyt vorliegt, ist wegen dem durch die Markierung teilweise überdeckten Kern bisweilen unmöglich, so daß lediglich Aussagen über den Anteil der Ia+-Zellen, aber nicht speziell der Ia+-Lymphozyten möglich ist (Abb. 10).

Unspezifische Mitreaktion der monozytären und granulozytären zelleigenen Peroxidase erschweren besonders bei den lymphozytär-monozytären Pleozytosen die Unterscheidung zwischen positiv markierten großen, eventuell auch transformierten Lymphozyten mit deformierten Kernen von aktivierten Monozyten deren hellbraunes Peroxidase-Produkt sich bisweilen homogen über den ganzen Zelleib verteilt.

Das Reaktionsprodukt der in Vesikeln gespeicherten granulozytären Peroxidase hingegen stellt sich dunkel bis schwarzbraun und grobgranulär dar und läßt sich besonders auch unter Mitbeachtung der Kernform gut als unspezifische Hintergrundsfärbung abgrenzen (vgl. Abb. 11 und 12).

Auch Erythrozytenreiche Zellsedimente zeigen eine erhebliche Hintergrundsfärbung, bedingt durch die endogene Peroxidase-Aktivität der roten Blutkörperchen.

Bei Hämolyse zeigte das ganze Präparat bisweilen eine goldbraune Färbung, die sich deutlich von dem im Normalfall klaren Zellbild unterschied (vgl. Abb. 2a).

Die starke unspezifische Hintergrundsaktivität bei lymphozytären-monozytären Mischpleozytosen und bei Ery-

throzytenreichen-hämolytischen Proben machte eine exakte quantitative Auswertung der Immunperoxidase-Markierung bei diesen Proben unmöglich. Längerfristig wird man zur immunologischen Zelltypisierung bei diesen Proben auf andere immunenzymatische Nachweistechniken, wie z.B. die Anwendung mit alkalischer Phosphatase gekoppelten sekundären Antikörpern (Gatter 1984) übergehen können.

Versuche zur Zerstörung der monozytären, granulozytären und erythrozytären Peroxidase durch Vorinkubation der Zellsedimente in 0,3 % Wasserstoffperoxid erbrachte bei Anwendung an den Liquorzellsedimenten deutlich morphologisch schlechter beurteilbare Präparate. Die Anfärbbarkeit der Zellkerne war deutlich reduziert, so daß auf die Anwendung dieses Schrittes zur Minderung der unspezifischen Hintergrundsfärbung die besonders bei histologischen Präparaten an Bedeutung gewinnt, verzichtet wurde.

Quantitative Auswertung der immunologischen Lymphozytentypisierung im Liquor von neurologisch und internistisch gesunden Patienten, von an Multiple Sklerose erkrankten Patienten und von Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen

Bei allen Proben wurde der Anteil der T 4+- und der T 8+-Lymphozyten bestimmt und ihr Verhältnis zueinander ermittelt.

Konnten zusätzliche Sedimente gewonnen werden, wurde der Anteil weiterer mononukleärer Zellpopulationen durch den Nachweis folgender zellulärer Antigene bestimmt: T 3, B 1, B 4, Ia. Dies wär nur an einzelnen Proben möglich; deshalb konnten diese Ergebnisse nicht systematisch ausgewertet werden.

In Tabelle 1 sind die ermittelten prozentualen Anteile der T 4+- und T 8+-Zellpopulationen an der angegebenen Gesamtzellenzahl einer Probe und das daraus bestimmte Verhältnis T 4 : T 8 in Krankheitsgruppen zusammengefaßt und nach Zellzahlen geordnet dargestellt. Die Liquores von MS-Patienten wurden einer der folgenden zwei Untergruppen zugeordnet:

Den normozytären Liquores mit einer Zellzahl kleiner oder gleich 16/3 oder der Gruppe der pleozytären MS-Liquores mit mehr als 16/3 Zellen.

Das quantitative Verteilungsmuster der T 4+- und T 8+-Zellpopulationen und der T 4 : T 8 Ratio im Liquor bei Gesunden und bei Patienten mit verschiedenen neurologischen Erkrankungen ist in den Abbildungen 1a, 1b und 1c graphisch dargestellt. Mittelwerte und Fehlerabweichung der Mittelwerte (S.E.M.) der ermittelten Werte

sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

In den Abbildungen 1a und 1b fällt zuerst der erhöhte Anteil sowohl der T4+, als auch der T 8+-Lymphozytenpopulation bei Meningitiden und etwas geringer ausgeprägt bei der Gruppe der chronischen Entzündungen auf.

Dabei ist die Multiple Sklerose ausgeklammert. Interessanterweise ist die Verteilung der T 4 : T 8 Ratio bei Meningitiden und chronisch entzündlichen Prozessen des Nervensystems gegenüber der Norm nicht verändert (siehe Abb. 1c). Der Anteil der T 4+- und T 8+-Lymphozyten im CSF ist bei den Meningitiden gegenüber der Norm signifikant erhöht (p kleiner 0,02 für die T-Helferzellen; p kleiner 0,5 für die T 8+-Lymphozytensubpopulation; zweiseitiger Wilcoxontest).

Vermutlich wegen der geringen Anzahl von Stichproben bei den chronisch entzündlichen Erkrankungen (n = 4) sind für diese Gruppe die Abweichungen der T 4+- und T 8+-Lymphozytenanteile gegenüber den Normalliquores nicht signifikant.

In der Abb. 1c fällt auf, daß sich das Verteilungsmuster der T 4 : T 8 Ratio bei den Meningitiden, den chronisch entzündlichen Erkrankungen und der pleozytären Multiplen Sklerose nicht signifikant gegenüber den Liquores neurochirurgischer Patienten oder neurologisch unauffälliger Patienten (Kontrollgruppe) unterscheidet.

Die Mittelwerte der T 4 : T 8 Ratio liegen bei allen diesen Gruppen um einen Wert von 2 (vgl. Tabelle 2).

Interessanterweise fällt einzig der bei den normozytären Multiple-Sklerose-Liquores ermittelte T 4 : T 8

Quotient aus diesem "Normbereich" heraus. Der Mittelwert des T 4 : T 8 Quotienten dieser Krankheitsgruppe liegt bei 3,46 ($\pm$ 0,52 S.E.M.) und ist nach dem zweiseitigen Wilcoxontest auf dem 5 %-Niveau gegenüber dem Mittelwert von 2,18 ($\pm$ 0.27 S.E.M.) der "Normalliquores" (p kleiner als 0,025) deutlich höher.

Da sich bei den Multiple-Sklerose-Proben ein von der Zellzahl abhängiger unterschiedlicher T 4 : T 8 Quotient ergab, wurde untersucht, ob sich eine solche Korrelation von Zellzahl zu Anteil der ermittelten Subpopulationen auch bei den anderen Krankheitsgruppen zeigen läßt.

Es fanden sich aber keine statistisch signifikanten Korrelationen der Zellzahl zu einer der Subpopulationen oder zum T 4 : T 8 Verhältnis, weder bei der Gruppe der Meningitiden, noch bei einer der anderen Krankheitsgruppen und auch nicht in der Gruppe der Normalliquores.

Dies bestätigt die Beobachtungen von Cashman 1982 der zeigte, daß zwischen dem Anteil der OKT 4+ und der OKT 8+-Zellen und der Anzahl der Zellen im Liquor keine Korrelation nachweisbar ist.

Inwieweit könnte aus der Grundgesamtheit der 39 Werte des T 4 : T 8 Quotienten, die in dieser Studie in sechs Untergruppen unterteilt wurden, eine der Gruppen sich mit dieser Signifikanz zufällig herauskristallisieren?

Die Wahrscheinlichkeit des erzielten Ergebnisses für die Untergruppe der Patienten mit normozytärer Multi-

pler Sklerose gegenüber den übrigen Patienten auf zufälliger Basis beträgt 0,00396 (zweiseitiger Wilcoxontest). Die Wahrscheinlichkeit eines solchen zufälligen Herausfallens einer oder mehrerer der sechs Untergruppen wäre demnach $1 - (1 - 0{,}00396)^6$ oder ungefähr 0,025 (2,5 %).

Es stellte sich die Frage, auf welche Veränderung in welcher Subpopulation die statistisch signifikante T 4 : T 8 Erhöhung bei den normozytären MS-Proben gegenüber den Normalliquores zurückzuführen ist.

Es fällt auf, daß der T 4+-Lymphozytenanteil dem der Norm entspricht, mit einer größeren Streubreite bei den Normalliquores (31.4 $\pm$ 6.6 S.E.M. gegenüber 31.9 $\pm$ 4.8 S.E.M. bei der normozytären Multiplen Sklerose).

Der Anteil der T 8+-Lymphozyten ist wie die graphische Darstellung (Abb. 1b) zeigt, bei den normozytären MS-Liquores gegenüber den Normalliquores deutlich erniedrigt, der Mittelwert der T 8+-Zellen liegt um ca. 30 % unter dem der Normalliquores, was jedoch wegen der geringen Populationsgröße noch nicht statistisch signifikant ist.

In der Gruppe der ätiologisch unklaren, chronisch entzündlichen Prozesse des zentralen und peripheren Nervensystems, die mit pleozytärem Liquor einhergehen, fällt auf, daß der Anteil der T4+-Lymphozyten um ca. 50 % höher liegt als im normalzelligen Liquor, bei relativ großer Streubreite. Der Mittelwert der T 8+-Lymphozyten ist nahezu doppelt so hoch wie im Normalliquor. Beide Abweichungen sind jedoch bei der kleinen Population nicht auf dem 5 %-Niveau signifikant.

In der Abb. 1b zeigt sich deutlich die ansteigende Tendenz des Anteils der T 8+-Lymphozyten von der Population der normalzelligen MS-Liquores, die den niedrigsten T 8+-Anteil aufweisen (10.0 $\pm$ 1.7) über die pleozytären MS-Liquores, die eine Mittelstellung einnehmen (17.0 $\pm$ 2.1) bis hin zu den höchsten T8+-Werten mit einem Mittelwert von 29.7 $\pm$ 4.6 bei den chronisch entzündlichen klinisch nicht klassifizierbaren Prozessen des Nervensystems.

Diese quantitativen Unterschiede in der T 8+-Population spiegeln sich reziprok in Veränderungen der T 4 : T 8 Ratio wider (Tabelle 2).

Bemerkenswert ist, daß der Mittelwert der T 8+-Lymphozyten bei den chronisch entzündlichen Prozessen nahezu genauso hoch liegt wie bei der Gruppe der akut ablaufenden Meningitiden unterschiedlicher Ätiologie. Bei letzteren jedoch findet sich eine gleichzeitige Zunahme der T 4+-Zellen, so daß ein "normales" T 4 : T 8 Verhältnis von 2.19 entsteht.

Nach den vorliegenden Ergebnissen an dem leider nur sehr kleinen Patientenkollektiv mit chronisch entzündlichen Erkrankungen nimmt hingegen der Anteil der T 8+-Zellen stärker zu als die T 4+-Zellen, so daß ein erniedrigter Mittelwert der T 4 : T 8 Ratio von 1.68 ($\pm$ 0.36) resultiert; ein Unterschied, der sich jedoch bei der kleinen Population nicht als statistisch signifikant darstellt.

Veränderungen der Liquorproteine in der Gruppe der Multiple-Sklerose-Patienten und dem Normalkollektiv

In Tabelle 3 sind die Mittelwerte und S.E.M. des Gesamtproteins im Liquor, des Albumins, und des Immunglobulin G (Ig G) und des Ig G zu Albuminquotienten dargestellt.

Bei den chronisch entzündlichen Prozessen des Nervensystems und dem neurochirurgischen Patientenkollektiv liegen die Mittelwerte des Gesamteiweißes über mehr als dem Dreifachen im Vergleich zu dem Wert der Normalliquores.

Auch bei den normozytären MS-Liquores liegt der Mittelwert des Gesamteiweißes deutlich über dem Normalkollektiv als der ermittelte Mittelwert der pleozytären MS-Liquores. Diese Unterschiede sind jedoch nicht statistisch signifikant.

Bei den Patienten mit pleozytärer Multipler Sklerose fällt eine erhöhte Ig G-Konzentration und ein statistisch signifikanter (p kleiner als 0.01) erhöhter Ig G : Albuminquotient gegenüber den Normalproben auf. Dies kann in Anlehnung an andere Autoren (Tourtelotte and Parker 1967) als intrathekale Immunglobulinenproduktion durch aktivierte B-Zellen im Liquor oder intracerebral, interpretiert werden.

Interessanterweise liegen die Mittelwerte der Albuminkonzentrationen im Liquor der normozytären Multiplen Sklerose mit 30,6 mg/dl $\pm$ 2.5 S.E.M. deutlich höher (p kleiner als 0,05) als bei den pleozytären MS-Proben und den Normalliquores mit 24,9 $\pm$ 4,3 mg/dl.

Dies kann als Ausdruck einer Permeabilitätssteigerung der Blut-Liquorschranke besonders bei den normozytären MS-Proben interpretiert werden (Tourtelotte 1979).

DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wird eine gut in der Routinediagnostik anwendbare Methode zur immunzytologischen Lymphozytentypisierung auf Liquorzellsedimenten vorgestellt.

Als spezielle Vorteile dieser Methode stellen sich folgende Punkte dar:

1. Zuverlässig lichtmikroskopische Beurteilbarkeit sowohl der Zellmorphologie als auch der immunologischen Markierung verschiedener lymphozytärer Subpopulationen

2. exakte, reproduzierbare quantitative und qualitative Auswertbarkeit der immunologischen Markierung sowohl der normozytären als auch der pleozytären Liquorzellsedimente, die mit der gleichen Methode gewonnen werden können, die sich bereits zur Gewinnung von Liquorzellbildern zur zytologisch-morphologischen Routinediagnostik bewährt hat.

3. Anwendbarkeit der Sandwich-Immunperoxidasemarkierung auf gefroren aufbewahrten Zellsedimenten, was einen rationellen Einsatz der Methode ermöglicht und gute Haltbarkeit und damit Dokumentierbarkeit der immunologisch markierten Zellsedimente.

So konnten bei den in dieser Arbeit sowohl von normalzelligen als auch von lymphozytär-pleozytären Liquores

hergestellten Zellsedimenten die nach ihren Oberflächenmarkern definierten T-Subpopulationen eindeutig markiert und quantitativ ausgewertet werden.

Es interessierte vor allem das Verteilungsmuster der T-Helfer und T-Suppressorlymphozyten bei akuten und chronisch entzündlichen Erkrankungen des ZNS im Vergleich zu dem bei neurologisch und internistisch gesunden Personen (Kontrollgruppe).

Die Ursache und detaillierten pathogenetischen Abläufe einer Reihe neurologischer Erkrankungen, so auch der Multiplen Sklerose sind unbekannt. So bleibt die Pathogenese der Multiplen Sklerose zum größten Teil im Dunkeln, obwohl zahlreiche in vivo-Untersuchungen und Beobachtungen, sowie in vitro Zellkultur-Experimente auf eine Beteiligung des Immunsystems bei dieser Erkrankung hinweisen. (Reinherz und Schlossman 1980, Lisak 1980, Cook 1980, Antel 1979, Merill 1982, Huddlestone and Oldstone 1982, Cashman 1982, Sandberg-Wollheim 1983, Santoli et al. 1984, Bach M.A. 1985.)

Defizite in der Immunregulation scheinen für eine Anzahl der für die Multiple Sklerose typischen zellulären, liquor- und blutchemischen Veränderungen verantwortlich zu sein (Levinson 1983, Antel 1984, Arnason 1984, Hafler 1985).

Untersuchungen der lymphozytären T-Zellsubsets sprechen dafür, daß eine quantitative Reduktion der T-Suppressorzellen (Weiner 1982, Hauser 1982, Cashman 1982) oder Defekte ihrer Funktion mit der Aktivität der Erkrankung korrelieren (Antel 1982, Reunanen 1982, Merill 1984, Reder 1984).

Ein interessanter Gesichtspunkt dieser Arbeiten ist, daß obwohl eine recht breite Übereinstimmung darin besteht, daß es vor allem im akuten Schub der Multiplen Sklerose zu einer Reduktion der physiologischen Immun-Suppression kommt, so sehr ist umstritten, was diese deutlich geringer ausgeprägte Hemmung der Immunantwort bedingt.

Vor allem in früheren Arbeiten (Allen 1976, Santoli 1978, Huddlestone and Oldstone 1979) wurde eine quantitative Reduktion der zirkulierenden T-Suppressor-Lymphozyten im peripheren Blut und Liquor für diese reduzierte Suppressionsfähigkeit verantwortlich gemacht.

Diese numerische Reduktion konnte in einigen neueren Arbeiten (Paty 1983, Rice 1984) nicht mehr bestätigt werden, während andere Autoren nur bei einem Teil der Patienten im klinisch aktiven MS-Schub eine Reduktion der T-Suppressorzellen nachweisen konnten (Weiner und Hauser 1982, Kastrukoff 1983, Oger et al. 1984, Bach 1985).

Es ist darauf hinzuweisen, daß viele der oben erwähnten Untersuchungen vor allem im peripheren Blut durchgeführt wurden (Bach, Kastrukoff, Paty, Rice).

In der hier vorliegenden Arbeit wurde deshalb der Frage nachgegangen, ob sich im Liquor wie auch zuvor im peripheren Blut eine Reduktion der T-Suppressorzellen bei Multiple Sklerose-Kranken nachweisen läßt und ob zweitens diese T 8-Zellreduktion im Liquor nur bei einem Teil der Patienten oder bei allen im akuten Stadium der Erkrankung auftritt.

Da bereits Sayk 1960 darauf hingewiesen hatte, daß man nur bei 60 % der Multiple Sklerose-Patienten pleozytären Liquor gewinnt, erscheint es sinnvoll, die Gruppe der MS-Liquores in die Untergruppen der normozytären (weniger oder gleich 16/3 Zellen) und der pleozytären Proben (mehr als 16/3 Zellen) einzuteilen und zu untersuchen, ob diese Einteilung eine Korrelation zu weiteren liquorzytologischen und liquorchemischen Parametern zuläßt.

Interessanterweise fand sich, daß von den auf diese Weise gebildeten sechs Probenkollektiven (siehe Tabelle 2) nur eine, nämlich die Proben der normozytären, klinisch aktiven Multiplen Sklerose einen deutlich abweichenden, nämlich signifikant höheren Wert der T 4 : T 8 ratio im Liquor aufwies.

Der Mittelwert der T 4 : T 8 ratio in dieser Gruppe lag bei 3,46 $\pm$ 0,52 (S.E.M.) gegenüber einem Wert von um 2 bei den fünf anderen Patientenkollektiven, inklusive der pleozytären Liquorproben bei klinisch aktiver Multipler Sklerose.

Es ist bemerkenswert, daß bei allen Gruppen mit unterschiedlichen neurologischen Erkrankungen und der Kontrollgruppe im Vergleich zu einem Teil der MS-Proben, nämlich den normozytären ein konstantes Verhältnis der T 4 : T 8 ratio im Liquor gefunden wurde.

Über eine entsprechende Beobachtung berichteten Weiner und Hauser 1982, die bei ihrer Analyse des T-Helfer- und T-Suppressorzellverteilungsmusters im peripheren Blut bei unterschiedlichen neurologischen Erkrankungen berichteten.

Bei allen Patientengruppen außer bei einem größeren Anteil der Patienten mit klinisch aktiver Multipler Sklerose fanden sie eine nicht von der Norm abweichende T 4 : T 8 ratio von kleiner als 4. Bei 34 von 59 Patienten mit klinisch aktiver Multipler Sklerose fanden sie eine T 4 : T 8 ratio größer als 4, ohne daß sie diese Patientengruppe nach klinischen oder laborchemischen Befunden weiter charakterisiert haben.

Diese Ergebnisse können in dem Sinne interpretiert werden, daß die T 4 : T 8 ratio eine relativ wenig störanfällige Größe darstellt und es bei einer Vielzahl neurologischer Erkrankungen nicht zu einer Proliferation, Anreicherung oder Reduktion einer dieser die Immunantwort regulierenden T-Lymphozyten-Subpopulationen weder im Liquor noch im peripheren Blut kommt.

Veränderungen der T 4 : T 8 ratio werden bei bestimmten viralen Infektionskrankheiten (Hepatitiden, infektiöse Mononucleose, Zytomegalie-Virusinfektionen, AIDS) beobachtet und sind bei Erkrankungen aus dem autoimmunologischen Formenkreis dokumentiert (Tosato 1979, Reinherz 1979, 1980, Bach M.A. 1981, Dalgleish 1984).

Um so überraschender war es, daß nur bei Patienten mit quantitativ normalzelligem Liquorzellbild im akuten Stadium der Multiplen Sklerose eine Reduktion der T-Suppressorzellen im Liquor nachgewiesen werden konnte, mit darausfolgender Erhöhung der T 4 : T 8 ratio. In der Gruppe der Patienten mit pleozytärem Liquorzellbild im klinisch aktiven Krankheitsstadium der Multiplen Sklerose hingegen fand sich eine im Vergleich zu der Kontrollgruppe normale T 4 : T 8 ratio (2,17 im Vergleich zu 2,18).

Diese Ergebnisse sind insofern interessant, als daß in neueren Arbeiten deutlich wurde, daß eine einfache Korrelation der klinischen Krankheitsaktivität zu der T 4 : T 8 ratio, wie man sie früher angenommen hatte (Allen 1976, Panitch 1982, Cashman 1982) nicht immer zwingend nachweisbar ist (Paty 1983, Kastrukoff 1983, Rice 1984, Bach 1985).

Auch in der hier vorliegenden Untersuchung des T-Helfer- und T-Suppressor-Verteilungsmusters im Liquor fand sich nur bei einem Teil der Patienten im klinisch aktiven Krankheitsstadium ein reduzierter T-Suppressorzellanteil im Liquor, während bei einem Großteil der Patienten (9 von 16) sich eine im Vergleich zur Kontrollgruppe normale T 4 : T 8 ratio fand.

Die vorliegenden Daten unterstützen eher die Vorstellung, daß die bei einem Teil der Multiple Sklerose-Kranken im peripheren Blut und Liquor gefundene Veränderung der T 4 : T 8 ratio eher als Ausdruck einer Dysregulation des Immunsystems zu interpretieren ist denn als Parameter für die klinische Krankheitsaktivität.

Die Ergebnisse können als Ausdruck dafür verstanden werden, daß bei der klinisch aktiven Multiplen Sklerose mindestens zwei nach immunzytologischen Kriterien definierte unterschiedliche Zustandsbilder vorliegen.

Bemerkenswerterweise unterschieden sich die normozytären und pleozytären Liquores in der hier vorgelegten Untersuchung nicht nur in ihrer immunzytologischen Zusammensetzung, sondern auch in liquorchemischen Parametern.

Bei den normozytären Liquores fand sich eine deutlich höhere Albuminkonzentration als bei den pleozytären Proben (30,6 mg/dl im Vergleich zu 21,0 mg/dl, p kleiner als 0,05). Das Ig G : Albuminverhältnis entsprach dem Normalkollektiv (0,16 Vergleich 0,14), wohingegen bei den pleozytären Proben das Ig G : Albuminverhältnis mit 0,44 deutlich höher lag (p kleiner als 0,01) (vergleiche Tabelle 3).

Reunanen hatte bereits 1982 auf eine Korrelation von Liquorzellzahl zur intrathecalen Immunglobulinproduktion hingewiesen, wohingegen eine Korrelation der T 4 : T 8 ratio zu der Immunglobulinproduktion oder zur Zellzahlerhöhung weder in der hier vorgelegten Arbeit noch von Cashman 1982 oder Steck und de Flaugergues 1984 nachgewiesen werden konnte.

Eine erhöhte Albuminkonzentration im Liquor bei der normozytären Multiplen Sklerose ist nicht ohne theoretisches und klinisches Interesse. Da Albumin nicht intrathecal synthetisiert werden kann im Gegensatz zu den Immunglobulinen, die von aktivierten B-Zellen im Liquorraum oder intracerebral synthetisiert werden können, deutet eine erhöhte Albuminkonzentration im Liquor auf eine Permeabilitätssteigerung der Blut-Liquorschranke für das hochmolekulare onkotisch wirksame Albumin des peripheren Blutes hin (Tourtelotte 1978).

Traugott und Reinherz wiesen 1983 die Kumulation von T-Suppressor- und direkt zytotoxischen Zellen in dem stark zellulär infiltrierten Randsaum von pathologisch-anatomisch definierten aktiven MS-Plaques nach.

Bei einer nicht neurologischen Erkrankung (minimal change glomerulonephritis) wird ein von aktivierten T-Suppressorzellen synthetisiertes Suppressorlymphokin (SIRS - soluble immune response suppressor) für die exzessive Permeabilitätssteigerung der glomerulären Membranen für Albumin verantwortlich gemacht (Schnaper und Aune 1985).

Im Hinblick auf die von Traugott und Reinherz 1983 nachgewiesene Kumulation der T-Suppressor/zytotoxischen Zellen im zellulär infiltrierten Randsaum von MS-Plaques ist ein ähnlicher Mechanismus der durch lösliche Faktoren (Lymphokine) vermittelte Permeabilitätssteigerung der Blut/Liquorschranke für Albumin zumindest bei Patienten mit normozytärem Liquor im akuten Krankheitsstadium denkbar.

Zusammenfassung

In meiner Arbeit wird eine für die Routinediagnostik geeignete indirekte doppelte Immunperoxidasetechnik zur qualitativen und quantitativen Erfassung zellulärer Subpopulationen in Liquorzellsedimenten mit monoklonalen Antikörpern vorgestellt.
Die monoklonalen Antikörper und die sekundären Enzym-gekoppelten Antikörper werden auf luftfixierten Liquorzellsedimenten angewendet, so daß es während der Markierungsprozedur selbst zu keinen weiteren Zellverlusten mehr kommt.

Die Erfassung der nach ihren Oberflächenmarkern definierten immunologischen Subpopulationen ist in Abhängigkeit von der Ausbeute des angewandten Zellgewinnungs- und Zellkonzentrierungsverfahren aus dem Liquor, sowohl in normo- als auch in pleozytären Liquores möglich.
Die Markierungstechnik mit ihren 5 Inkubationsschritten und 6 Waschvorgängen dauert 210 Minuten. Trotz dieser Zeit- und Personalintensiven Durchführung der Immunenzymatischen Markierungstechnik ist sie in der Routineanwendung rationeller und kostensparender als die bisher übliche Immunfluoreszenztechnik. Sie kann an bis zu 30 Präparaten, die gefroren aufbewahrt werden können, in einem Arbeitsgang durchgeführt werden. Zudem erfordert sie keine Anschaffung kostspieliger Geräte wie z.B. einem Fluoreszenzmikroskop.
Das Produkt der enzymkatalysierten Reaktion, welches als Indikator für die zellulär gebundenen Antikörper dient, ist lichtmikroskopisch eindeutig identifizierbar. Die Güte der gleichzeitig möglichen morphologischen Beurteilung der Zellen,

ist wiederum abhängig von der Technik der schonenden Zellgewinnung und ist besonders bei der immunologischen Klassifikation maligner Zellen von Bedeutung.
Die immunologische Markierung bleicht über Monate nicht aus, so daß Dokumentation, Nachuntersuchung sowie Demonstration erleichtert werden.

Die ersten quantitativen Ergebnisse in normo- und pleozytäre Liquor unterschiedlicher Pathogenese werden dargelegt. Trotz des relativ kleinen Probenkollektivs ergeben sich aufschlußreiche bisher noch nicht beschriebene Korrelatione zwischen Liquorzellzahl und Veränderung der T 4 : T 8 ratio im akuten Stadium der Multiplen Sklerose.
Im akuten Stadium der Multiplen Sklerose finden sich zwei nach immunologischen, liquorzytologischen und liquorchemisch Befunden unterschiedliche Zustandsbilder.
Typ I zeichnet sich durch ein quantitativ normales Zellbild, fehlende oder nur gering ausgeprägte intrathecale Immunglobulinsynthese, einer erhöhten Permeabilität der Blut- Liquorschranke für Albumin sowie durch einen signifikant erniedrigten T- Suppressorzellanteil im Liquor im Vergleich zu den fünf anderen untersuchten Krankheitsgruppen aus.
Nur in diesen normozytären Liquorproben im klinisch aktive Krankheitsstadium der Multiplen Sklerose fand sich eine erhöhte T 4 : T 8 ratio.

Typ II , nach liquorzytologischen und liquorchemischen Parametern definiert, der im klinisch akuten Stadium der Multiplen Sklerose gefunden wurde, ist durch eine Liquorpleozytose mit normaler T 4 : T 8 ratio, ohne ausgeprägte Permeabilitätssteigerung für Albumin, jedoch mit deutlich erhöhter Immunglobulinkonzentration gegenüber Typ I charakterisierbar.

So scheint Typ I eher dem Zustand einer immunologischen Dysregulation oder einem partiellen Immundefekt zu entsprechen mit fehlender Zellzahlerhöhung, fehlender Immunglobulinproduktion, bei jedoch gleichzeitiger Reduktion der T- Suppressorzellen, und einer erhöhten T 4: T 8 ratio (bis über 3).

Der pleozytäre MS - Liquor Typ II hingegen zeigt die typischen Zeichen eines intrathecalen entzündlichen Prozeßes mit Pleozytose und intrathecaler Immunglobulinproduktion, bei einem im Vergleich zum Normalkollektiv und den anderen drei Patientengruppen unauffälligem T 4 : T 8 verhältnis von ca 2.

Tabelle 1: Rohwerte

Normalliquores (7)

	T 4+ %	T 8+ %	T 4 : T 8
H. 2/3	20	21	0.95
St. 8/3	18	8	2.25
M. 8/3	14	4.7	2.98
K. 9/3	49	26	1.88
B. 12/3	41	16	2.56
Q. 13/3	30	10	3.00
S. 16/3	65	23	2.83

Meningitiden (6)

K. 77/3	47	15	3.13 (bakteriell)
E. 383/3	54	20	2.70 (bakteriell)
H. 443/3	52	33	1.58 (viral)
W. 1850/3	63	28	2.25 (viral)
Kl.10000/3	73	36	2.03 (bakteriell)
St.18000/3	67	43	1.56 (viral)

Chronisch entzündliche lymphozytäre Liquorsyndrome (4)

Z. 10/3	38	29	1.31
M. 43/3	45	43	1.05
R. 48/3	39	23	1.70
K. 170/3	65	24	2.71

Fortsetzung Tabelle 1 - Rohwerte

Normozytäre ≤ 16/3 MS-Liquores (7)

	T 4+ %	T 8+ %	T 4 : T 8
B. 5/3	29	6	4.83
T. 6/3	15	8	1.87
Br. 13/3	22	6.3	3.49
E. 14/3	48	13	3.69
K. 15/3	27	15	1.80
H. 16/3	49	16	3.06
G. 16/3	33	6	5.50

Pleozytäre ≥ 16/3 MS-Liquores (9)

L. 23/3	16	15	1.06
Sch. 24/3	45	32	1.41
B. 33/3	39	17	2.29
R. 40/3	29	17	1.71
H. 49/3	45	14	3.21
St.-Ch. 66/3	40	12	3.33
Ku. 73/3	25	12	2.08
W. 77/3	24	13	1.84
E. 175/3	55	21	2.62

Nicht entzündliche Erkrankungen des ZNS mit oder ohne Fremdkörperpleozytose (6)

L. 2/3	10	2.9	3.45
S. 6/3	14	10.0	1.40
St. 57/3	14	7.0	2.00
S. 120/3	10	15.0	0.67
B. 343/3	27	14.0	1.93
W. 2900/3	36	19.0	1.9[illegible]

Tabelle der liquorchemischen Befunde

	Gesamteiweiß	Albumin	Ig G	Ig G / Albumin	Lactat
Normalliquores					
H. 2/3	29	--	--	--	1.6
St. 8/3	29	--	--	--	1.36
M. 8/3	48	31.9	4.5	0.14	1.49
K. 9/3	35	--	--	--	1.15
B. 12/3	33	25.8	3.1	0.12	1.17
Q. 13/3	23	17	2.9	0.17	1.35
S. 16/3	22	18.3	2.5	0.13	1.16
Meningitiden					
K. 77/3	28	24.4	3.6	0.14	1.74
E. 383/3	93	--	--	--	1.66
H. 443/3	39	--	--	--	1.39
W. 1850/3	52	--	--	--	1.98
Kl.10000/3	1250	--	--	--	9.63
St.18000/3	41	--	--	--	1.42
Andere chronisch entzündliche lymphozytäre Liquorsyndrome					
Z. 10/3	98	77.1	9.1	0.11	---
M. 43/3	32	--	--	--	1.03
R. 48/3	138	--	--	--	1.79
K. 170/3	129	77.2	14.7	0.19	2.05

Fortsetzung Tabelle der liquorchemischen Befunde:

Nicht entzündliche Erkrankungen des ZNS mit oder ohne Fremdkörperpleozytose:

	Gesamteiweiß	Albumin	Ig G	Ig G / Albumin	Lactat
L. 2/3	68	36	6.6	0.18	1.97
S. 6/3	239	--	--	--	5.24
St. 57/3	60	--	--	--	1.31
S. 120/3	61	--	--	--	
B. 343/3	205	--	--	--	2.57
W. 2900/3	82	--	--	--	3.27
Normozytäre MS-Liquores ≤ 16/3					
B. 5/3	40	24.9	4.1	0.16	1.85
T. 6/3	45	29.7	4.8	0.16	1.30
Br. 13/3	39	29.5	2.1	0.07	1.68
E. 14/3	34	25.8	4.7	0.18	1.34
K. 15/3	77	41.6	8.0	0.19	2.14
H. 16/3	33	24.9	6.3	0.25	1.20
G. 16/3	46	32.8	4.4	0.13	1.34
Pleozytäre MS-Liquores ≥ 16/3					
L 23/3	37	22.8	8.4	0.36	1.1
Sch. 24/3	34	19.6	6.6	0.33	1.0
B. 33/3	52	25	11.8	0.47	1.11
R. 40/3	27	16.8	5.2	0.30	1.53
H. 49/3	25	12.9	3.7	0.28	1.22
St-Ch. 66/3	47	23.2	15.4	0.66	1.45
Ku. 73/3	32	22.8	8.7	0.38	1.32
W. 77/3	30	20.4	4.0	0.19	1.15
E. 175/3	62	29.5	2.0	0.06	1.25

Tabelle 2:

Liquorzytologische Befunde bei 5 untersuchten Patientenkollektiven und einem Normalkollektiv

Angabe der Mittelwerte ± S.E.M. (Standard error of mean)

	Zellzahl/3 mc	T 4+ %	T 8+ %	T 4 : T 8
Gesunde (7)	9.25 ± 1.54	31.4 ± 6.6	14.8 ± 2.8	2.18 ± 0.27
Meningitiden (6)	1100+ (77 - 18.000)	59.3 ± 4.0	29.2 ± 4.2	2.19 ± 0.25
MS-normozytär ≤ 16/3 (7)	12.1 ± 1.8	31.9 ± 4.8	10.0 ± 1.7	3.46 ± 0.52
MS-pleozytär ≥ 16/3 (9)	49+ (23 - 175)	35.3 ± 4.2	17.0 ± 2.1	2.17 ± 0.25
andere chronische lymphozytäre Liquorsyndrome (4)	45.5+ (10 - 170)	46.7 ± 6.3	29.7 ± 4.6	1.68 ± 0.36
nicht entzündliche ZNS-Erkrankungen mit oder ohne Fremdkörperpleozytose (6)	120+ (2 - 2900)	19.4 ± 5.2	11.4 ± 2.8	2.07 ± 0.43

+) Wegen der großen Streubreite dieser Population wurde auf die Darstellung des Mittelwertes und des standard error of mean (S.E.M.) verzichtet. Statt dessen wird der Median und in Klammern die Streubreite angegeben.

Tabelle 3:

Liquorchemische Befunde bei 5 untersuchten Patientenkollektiven und einem Normalkollektiv

Angabe der Mittelwerte ± S.E.M. (standard error of mean)

	Gesamteiweiß (mg/dl)	Albumin (mg/dl)	Ig G (mg/dl)	Ig G:Albumin
Normalkollektiv	31.3 ± 3.3 (7)+	24.9 ± 4.3 (3)	3.5 ± 0.5 (3)	0.14 ± 0.01 (3)
Normozytäre MS	44.9 ± 5.7 (7)	30.6 ± 2.5 (6)	5.0 ± 0.8 (6)	0.16 ± 0.02 (6)
Pleozytäre MS	38.4 ± 4.2 (9)	21.0 ± 2.8 (4)	9.9 ± 2.5 (4)	0.45 ± 0.08 (4)
Meningitiden	49.6 ± 10.8 (6)	---	---	---
andere chronisch entzündliche Liquorsyndrome	99.3 ± 24.0 (4)	---	---	---
Nicht entzündliche ZNS-Erkrankungen mit oder ohne Fremdkörperpleozytose	95.2 ± 27.7 (6)	---	---	---

+) Anzahl der untersuchten Proben

Tabelle 4:

Befundkonstellationen im Liquor bei Patienten mit klinisch aktiver Multipler Sklerose

	Typ I	Typ II
Gesamtzellzahl	normal	erhöht
Immunglobulin G	normal	erhöht
Albumin	erhöht	normal
T 4 : T 8	erhöht	normal

Tabelle 5:

Monoklonale Antikörper	Zelltyp	Markierungsmuster
OKT 3	Pan-T-Zellen	Schwach randständig
OKT 4	T-Helfer-Zellen	Intensiv goldbrauner
OKT 8	T-Suppressor-Zellen	"zytoplasmatischer" Markierungstyp; ev. mit randständiger Betonung
B 1	Immunkompetente B-Zellen	Schwach randständig "perlschnurartig"
Ia	90 % der B-Zellen Monozyten aktivierte T-Zellen	Farbintensiv über die ganze Zelle verteilter u.U. "fransig" aussehender Markierungstyp.

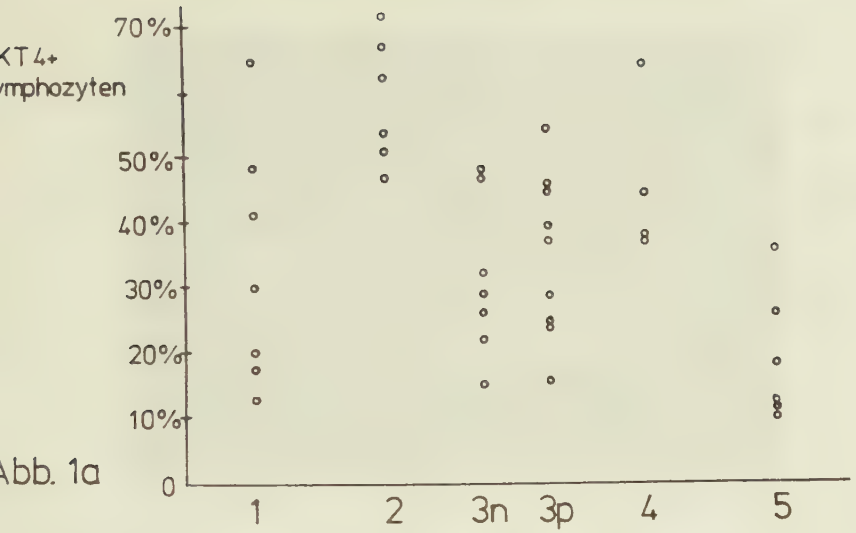
KT4+
ymphozyten
70%
50%
40%
30%
20%
10%
0
1
2
3n
3p
4
5

Abb. 1a

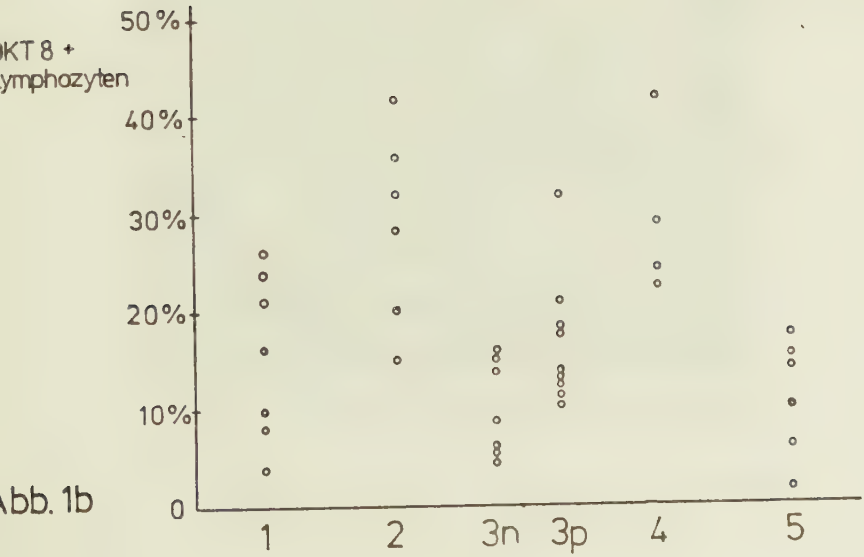
KT8+
ymphozyten
50%
40%
30%
20%
10%
0
1
2
3n
3p
4
5

Abb. 1b

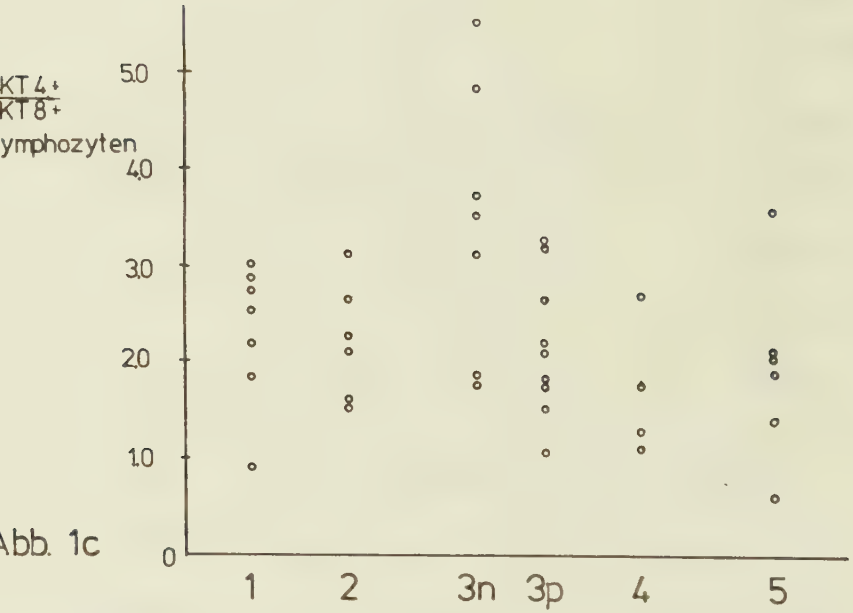

Abb. 1c

Anteil der T 4+ Helfer- und der T 8+ Suppressorzellen bei unterschiedlichen Erkrankungen und in Normalliquores.

Es bedeuten:

1	Normalliquores
2	Meningitiden (viral und bakteriell)
3n	normalzellige MS-Liquores
3p	pleozytäre MS-Liquores
4	andere chronisch entzündliche lymphozytäre Liquorsyndrome
5	nicht entzündliche Erkrankungen des ZNS mit oder ohne Fremdkörperpleozytose

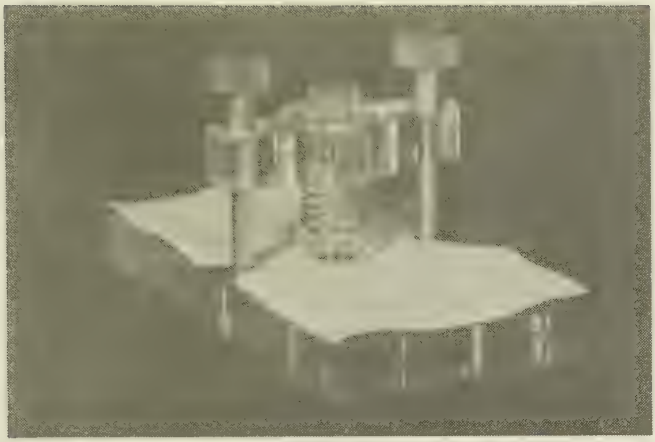

Abb. 1 Modifizierte Saykssche Sedimentationskammer

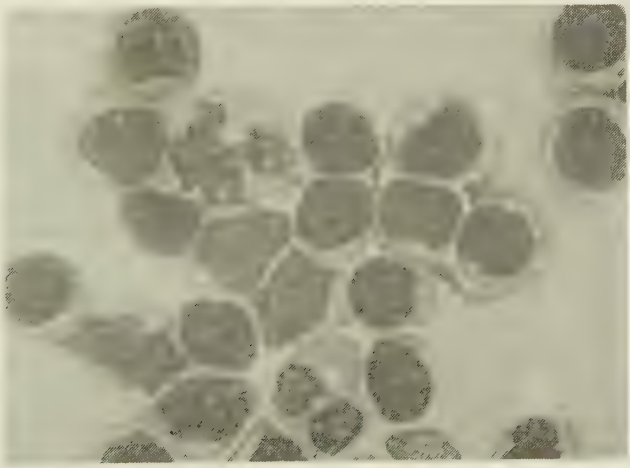

Abb. 2 Pappenheimfärbung eines Liquorzellsedimentes gewonnen durch Spontansedimentation

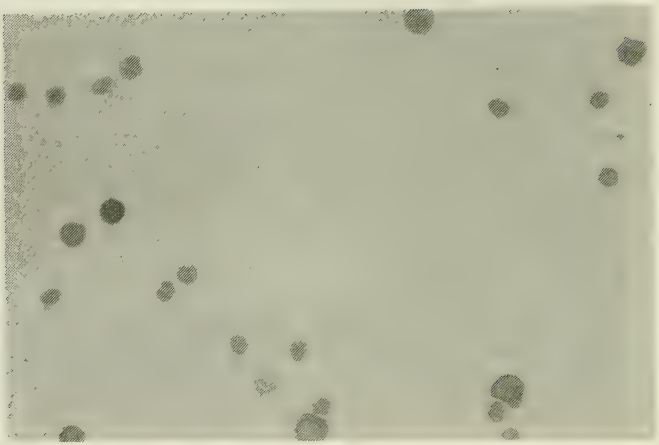

Abb. 3a Immunperoxidasemarkierung zum Nachweis T 8+-Suppressor-Lymphozyten in einem mäßiggradig pleozytären Liquorzellsediment von einem an Multipler Sklerose Erkrankten

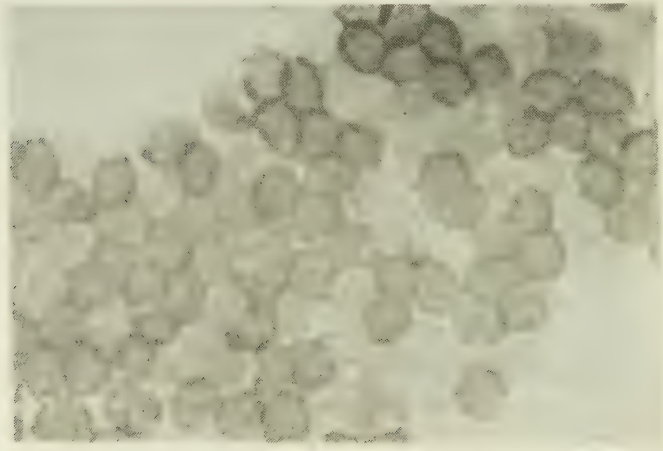

Abb. 3b Immunperoxidasemarkierung zum Nachweis T 4+-Helferlymphozyten bei stark ausgeprägter Pleozytose im Rahmen einer viralen Meningitis.

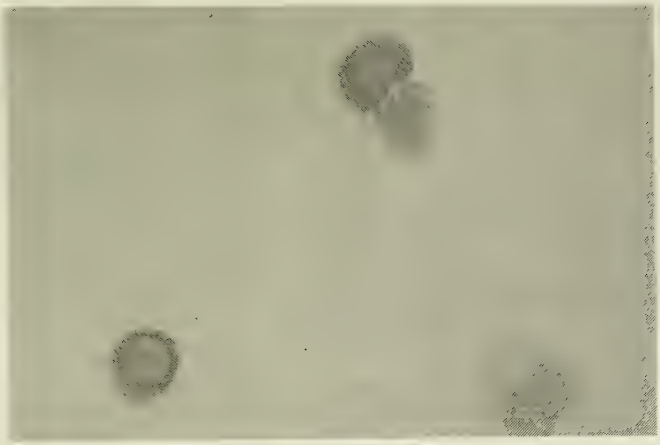

Abb. 4 T 4+-Helferlymphozyten, T 4 negativer Lymphozyt und ein Monozyt

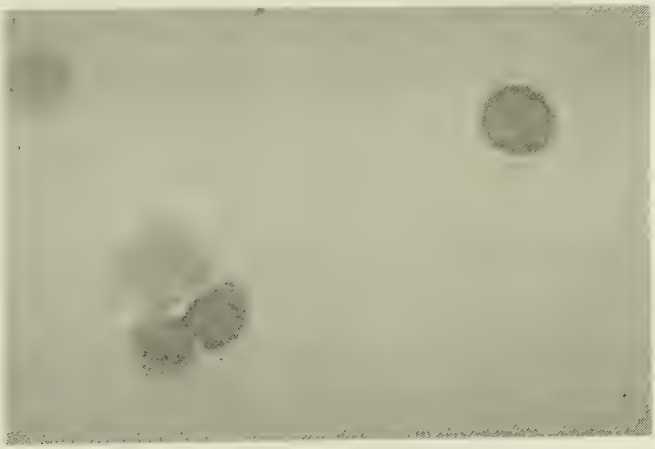

Abb. 5 T 8+-Suppressorlymphozyten, T 8 negative Lymphozyten und ein Monozyt.

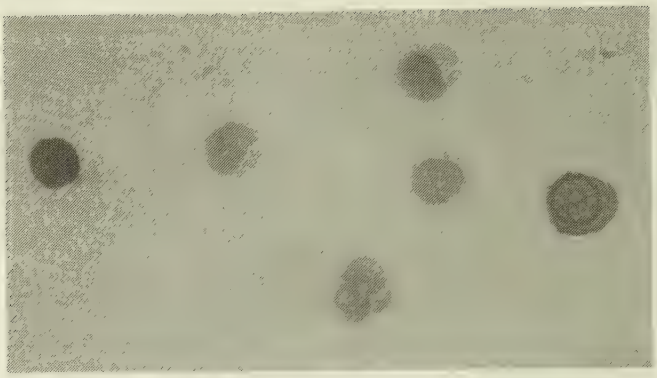

Abb. 6 Unterschiedliche Markierungsformen bei T 4+ Helferlymphozyten

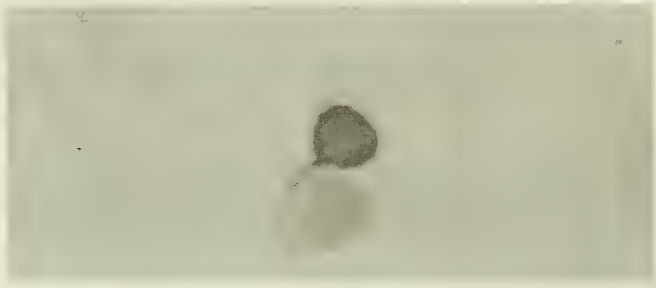

Abb. 7 Kleiner markierter T 8+-Suppressorlymphozyt und Monozyt

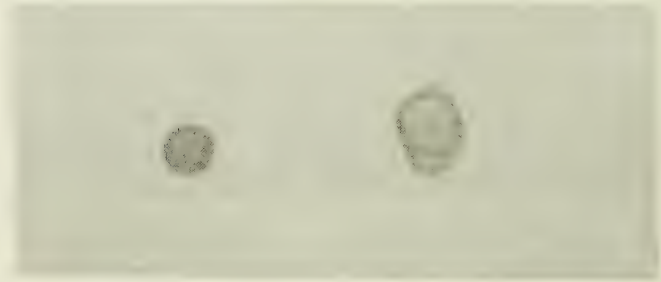

Abb. 8 Großer und kleiner markierter T 8+-Suppressorlymphozyt

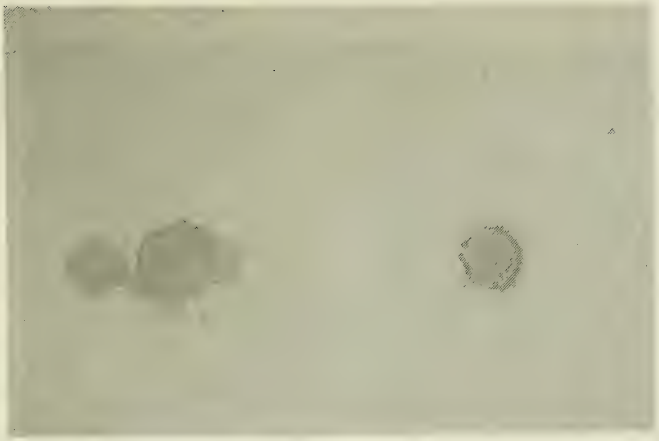

Abb. 9 B 1 positiver Lymphozyt. Schwache unspezifische Mitmarkierung eines Monozyten

Abb. 10 Ia-positiver Monozyt

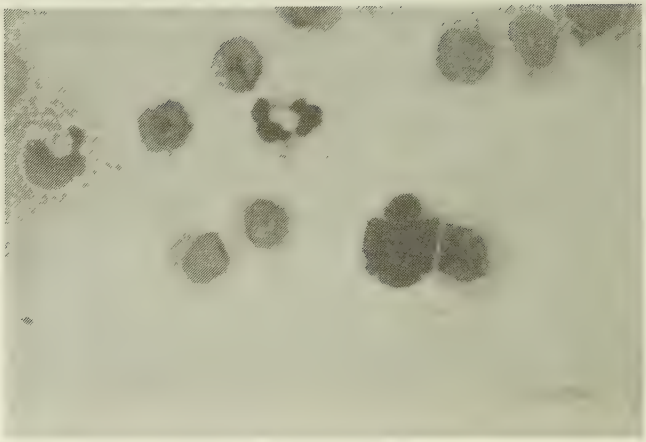

Abb. 11 Positive Mitreaktion der endogenen Peroxidase eines eosinophilen Granulozyten bei tuberkulöser Meningitis.

Abb. 12 Vesikulär verpackte endogene Peroxidase eines basophilen Granulozyten

LITERATURVERZEICHNIS

ALLEN, J.C., SHEREMATA, W., CROSGROVE, J.B.R., OSTERLAND, K., and SHEA, M.:
Cerebrospinal fluid T and B lymphocyte kinetics related to exacerbations of multiple sclerosis.
Neurology 26: 579-583; 1976

ANTEL, J., ARNASON, B.G.W., and MEDOF, M.E.:
Supressor cell function in multiple slcerosis. Correlation with clinical disease activity.
Ann. Neurol. 5: 339-342, 1979.

ANTEL, J., OGER, J.J.-F., JACKEVICIUS, S., HAN HWA KUO, and ARNASON, B.G.W.:
Modulation of T-lymphocyte differentiation antigens: Potential relevance for multiple sclerosis.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 3330-3334, 1982.

ANTEL, J., ROSENKOETTER, M., REDER, A., OGER, J.J.-F., and ARNASON, B.G.W.:
Multiple sclerosis: Relation of in vitro Ig G secretion to suppressor cell number and function.
Neurology 34: 1155-60; 1984.

ARNASON, B.G.W., ANTEL, J.P., and REDER, A.T.:
Immunoregulation in multiple sclerosis.
Ann. N.Y. Acad. Sci 436: 133-139; 1984.

AVRAMEAS, S.:
Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Use of the conjugates for the detection of antigens and antibodies.
Immunochemistry 6: 43-52, 1969.

BACH, J.F.:
Thymic factors, Prog. Allery 21: 342-348, 1976.

BACH, M.A., and BACH, J.F.:
The use of monoclonal anti-T-cell antibodies.
Clin.Exp. Immunol. 45: 449-456; 1981.

BACH, M.A., MARTIN, C., CESARO, P., EIZENBAUM, J.F., and DEGOS, J.D.:
T-cell subsets in multiple sclerosis.
J. Neuroimm. 7: 331-343; 1985.

BELLON, B., SAPIN, C., and DRUET, P.:
Comparaison de la sensibilité des techniques d'immunofluorescence et d'immunoperoxydase en méthodes directe et indirecte.
Ann. Immunal. 126 C: 15-22, 1975.

BHAN, A.K., REINHERZ, E.L., POPPEMA, S., McCLUSKEY, R.T., and SCHLOSSMAN, S.F.:
Location of T-cell and MHC antigens in the human thymus.
J. Exp. Med. 152:772-782, 1980.

BISCHOFF, A.:
Das Vorkommen von Plasmazellen im Liquor cerebrospinalis bèi der Multiplen Sklerose.
Dtsch.Z. Nervenkr. 185: 234-241, 1964.

BÖYUM, A.:
Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 21 (Suppl. 97): 77-89, 1968.

BURNET , F.M.:
The Clonal Selection Theory.
Cambridge University Press, 1958.

BURNS, J.A., HAMBRIDGE, M., and TAYLOR, C.R.:
Intracellular immunoglobulins: A comparative study on three standard tissues processing methods.
J. Clin. Pathol. 27: 548-557, 1974.

CANTOR, H., and BOYSE, E.A.:
Functional subclasses of T-lymphocyte receptors bearing different Ly antigens.
J. Exp. Med. 141: 1376-1382, 1975.

CASHMAN, N., MARTIN, C., EIZENBAUM, J.F., and DEGOS, J.D.:
Monoclonal antibody definied immunoregulatory cells in multiple sclerosis cerebrospinal fluid.
J. Clin. Invest. 70: 387-392, 1982.

CLEMENT, L.T.:
Phenotypic characterization of human E-rosette forming cells with cytotoxic effector functions.
J. Clin. Immunol. 4: 395-401, 1984.

COOK, St.D., and DOWLING, P.C.:
Multiple sclerosis and viruses: An overview.
Neurology 30: 80-91, 1980.

COONS, A.H., CREECH, H.J., JONES, R.N., and BERLINER, E.:
The demonstration of pneumococcal antigen in tissues by the use of fluorescent antibody.
J. Immunol. 45: 150-162, 1942.

COOPER, M.D., PETERSON, R.D.A., SOUTH, M.A., and GOOD, R.A.:
The functions of the thymus system and the bursa system in the chicken.

J.Exp. Med. 123: 75-86, 1966.

DALGLEISH, A.G., BEVERLEY, P.C.L., CLAPHAM, P.R., CRAWFORD, D.M., GREAVES, M.F., and WEISS, R.A.:
The CD 4 (T 4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS-retrovirus.
Nature 312: 763-767, 1984.

DE COCK, W., DE CREE, J., and VERMAEGEN, H.:
An enzyme immunoassay for the enumeration of peripheral human T-lymphocytes.
J. Immunol. Meth. 43: 131-134; 1981.

EVANS, R.L., LAZARUS, H., PENTA, A.C., and SCHLOSSMAN, S.F.:
Two functionally distinct subpopulations of human T cells that collaborate in the generation of cytotoxic cells responsible for cell-mediated lympholysis.
J. of Imm. 120:1423-1428, 1978.

FARR, A.G., and NAKANE, P.K.:
Immunohistochemistry with enzyme labelled antibodies: a brief review.
J. Immunol. Meth. 47: 129-144; 1981.

GATTER, K.C., ABDULAZIZ, A., BEVERLY, P., CORVALAN, J.R.F.; FORD, C., LANE, E.B., MOTA, M., NASH, J.R.G., PULFORD, K.A.F., STEIN, H., TAYLOR-PAPADIMITRIOU J., WOODHOUSE, C., and MASON, D.Y.:
Use of monoclonal antibodies for the histopathological diagnosis of human malignancy.
J. Clin. Path. 35: 1253-1267, 1984.

GERSHON, R.K.:
Suppressor T-cells in Forugereau M. and Dausset, J., (ed.), Immunology 80 - Progress in Immunology.
London Academic Press 1980: 373-401.

GRAHAM, R.C., and KARNOVSKY, M.J.:
Ultrastructural cytochemistry by a new technique.
J. Histochem. Cytochem. 14: 291-302; 1966.

HAFLER, D.A., FOX, D.A., MANNING, M.E., SCHLOSSMAN, S.F., and REINHERZ, E.L., WEINER, H.L.:
In vivo activated T lymphocytes in the peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis.
N. Engl. J. Med. 312: 1405-1411; 1985.

HAUSER, S.L., BRESNAN, M.J., REINHERZ, E.L., and WEINER, H.L.:
Childhood multiple sclerosis. Clinical features and demonstration of changes in T-cell subsets with disease activity.
Ann.Neurol. 11: 463-468, 1982.

HAUSER, S.L., REINHERZ, E.L., HOBAN, C.J., SCHLOSSMAN, S.F., and WEINER, H.L.:
Immunoregulatory T-cells and lymphocytotoxic antibodies in active multiple sclerosis.
Ann. Neurol. 13: 418-428; 1983.

HOHLFELD, R., SCHWARTZ, A., BROCKE, U., TOYKA, K.V.:
A practicable Method for the Analysis of T-Lymphocyte Subsets in CSF-Lymphopleocytosis.
Klin. Wochenschr. 61: 933-934; 1983.

HUDDLESTONE, J.R., and OLDSTONE, M.B.A.:
T suppressor (T_G) lymphocytes fluctuate in parallel with changes in the clinical course of patients with multiple sclerosis.
J. Immunol. 123: 1615-1618, 1979.

HUDDLESTONE, J.R., and OLDSTONE, M.B.A.:
Suppressor T cells are activated in vivo in patients with multiple sclerosis coinciding with remission.
J. Immunol. 129: 915-917, 1982.

JERNE, N.K.:
The generative grammar of the immune system.
EMBO Journal 4: 847-852; 1985.

JONDAL, M., WIGZELL, H., and AIUTI, F.:
Human lymphocyte Subpopulations.
Transplant. Rev. 16: 163-195; 1973.

KASCHKA-DIERICH, C.M., BANDLOW, G., THOMSSEN, R.:
An immunperoxidase Method for the Identification of B-Lymphocytes by light-microscopy.
Z. Immun.Forsch. 153: 174-178, 1977.

KASTRUKOFF, L.F., and PATY, D.W.:
A Serial Study of peripheral Blood T-lymphocyte Subsets in relapsing Multiple Sclerosis.
Ann. Neurol. 15: 250-256; 1984.

KÖHLER, G., and MILSTEIN, C.:
Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.
Nature: 256: 494-497; 1975.

KÖLMEL, H.W.:
A method for concentrating cerebrospinal fluid cells.
Acta cytologica 21: 154-157, 1977.

KÖLMEL, H.W.:
Liquorzytologie.
Springer-Verlag, 1978.

KÖLSCH, E.:
Interaction of Suppressor and Helper Antigenic Determinants in the Dominance of either Tolerance or Immunity.
Scand. J. Immunol. 19: 387-393, 1984.

KNOWLES, D.M., WINCHESTER, R.J., and KUNKEL, M.G.:
A comparison of peroxidase and fluorchrome conjugated antisera for the demonstration of surface and intracellular antigens.
Clin. Immunol. Immunopath. 7: 410-425; 1977.

LAURENT, G., GOURDIN, M.F., and REYES, F.:
Detection of surface immunoglobulins of human lymphoid cells: a comparative study of live and fixed cells using a direct immunoperoxidase procedure.
J. Clin. Pathol. 35: 139-143; 1982.

LEES, O.:
Immunperoxidase Method of B-lymphocyte recognition.
Europ. J. Canc. 13: 345-349; 1977.

LISAK, R.P.:
Multiple sclerosis: Evidence for immunopathogenesis.
Neurology 30: 99-105, 1980.

LEVINSON, A.J., SANDBERG-WOLLHEIM, M., LISAK, R.P., ZWEIMAN, B., SIOGREN, K., LARAMORE, C., MOSKOVITZ, A.R., and HEDSTROM, S.:
Analysis of B-cell activation of cerebrospinal fluid lymphocytes in multiple sclerosis.
Neurology 33: 1305-10, 1983.

MASON, D.Y., LEONARD, R.CF., LAURENT, G., and GOURDIN, M.F.:
Immunperoxidase staining of surface and intracellular

immunoglobulin in human neoplastic lymphoid cells.
J. Clin. Pathol. 33: 609-616; 1980.

MASON, D.Y., BELL,J.J., CHRISTENSSON,B., and BIBERFELD, P.:
An immunhistological study of human lymphoma.
Clin. Exp. Immunol. 40: 235-248, 1980.

McKEEVER, P.E., GARVIN, A.J., and SPICER, S.S.:
Immune complex receptors on cell surfaces.
J. Histochem. Cytochem. 24: 948-955; 1976.

MERILL, J.E., BIBERFELD, G., LANDIN, S., SIDEN, A., and NORRBY, E.:
Identification of three Fc-Receptor positive T-cell subsets in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients.
Clin. Exp. Immunol. 42: 345-354, 1980.

MERILL, J.E., ELLISON, G.W., MYERS, L.W., SCOTT, A.:
Cytotoxic activity of peripheral blood and cerebrospinal fluid lymphocytes from patients with multiple sclerosis and other neurological diseases.
- J. Neuroimmunol. 3: 123-128; 1982.
- Clin. Immunol. and Immunopath. 31: 390-402; 1984.

MILLER. K.B., and SCHWARTZ, R.S.:
Familial abnormalities of suppressor cell functions in systemic lupus erythematosus.
N. Engl. J. Med. 30: 803; 1979.

MOIR, D.J., GHOSH, A.K., ABDULAZIZ, Z., KNIGHT, P.M., MASON, D.Y.:
Immunoenzymatic staining of haematological samples with monoclonal antibodies.
Brit. J. Haematol. 55: 395-410; 1983.

MÖLLER, G.:
Demonstration of mouse isoantigens at cellular level by the fluorescent antibody technique.
J. Exp. Med. 114: 415-423; 1961.

MÖLLER, G. (Ed.):
Suppressor T lymphocytes.
Transplant. Rev. 26; 1975.

NAKANE, P.K., and PIERCE, G.B.:
Enzyme labelled antibodies: Preparation and application for localization of antigens.
J. Histochem. Cytochem. 14: 929-938; 1966.

NISSL, F.:
Über die Bedeutung der Lumbalpunktion für die Psychiatrie.
Centralblatt für Nervenheilkunde und Psych. 27: 225, 1904.

OGER, J., JACKEVICIUS, S., ANTEL, J.P., and ARNASON, P.G.W.:
Reduced OKT 8+ and OKT 3+ Cells in blood of progressive MS-patients.
Ann. N.Y. Academic Scienc. 436: 506-507;1984.

OLISCHER, R.M.:
Die Zellreaktionen des Liquor cerebrospinalis.
Habilitationsschrift, Rostock 1969.

OWEN, R.D.:
Immunogenetic consequences of vascular anastomoses between bovine twins.
Science 102: 400; 1945.

PANITCH, H.S., and FRANCIS, G.S.:
T-lymphocyte subsets in cerebrospinal fluid in

multiple sclerosis.
N. Engl. J. Med. 307: 560-561, 1982.

PATY, D.W.; KASTRUKOFF, L., MORGAN, N., and HIOB, L.:
Suppressor T-lymphocytes in multiple sclerosis.
Ann. Neurol. 14: 445-449; 1983.

RAFF, M.C.:
Two distinct populations of peripheral lymphocytes
in mice distinguishable by immunfluorescence.
Immunology 19: 637-650, 1970.

RAFF, M.C.:
Surface antigenic markers for distinguishing
T- and B-lymphocytes in mice.
Transplant Rev. 6: 52-80. 1971.

RAFF, M.C.:
T- and B-Lymphocytes and immune response.
Nature 242: 19-23; 1973.

REDER, A.T., ANTEL, J.P., OGER, J.J.-F., McFARLAND, T.A.,
ROSENKOETTER, M., and ARNASON, B.G.W.:
Low T 8 antigen density on lymphocytes in active
Multiple Sclerosis.
Ann. Neurol. 16: 242-249; 1984.

REINHERZ, E.L. and SCHLOSSMAN, S.F.:
Current concepts in immunology-regulation of the
immune response.
N. Engl. J. Med. 303: 370-383; 1980.

REINHERZ, E.L., O'BRIEN, C., ROSENTHAL, P., and SCHLOSS-
MAN, S.F.:
The cellular basis for viral-induced immunodeficiency:
Analysis by monoclonal antibodies.

J. Immunol. 125: 1269-1274; 1980.

REINHERZ, E.L., WEINER, H.L., HAUSER, S.L., COHEN, J.A., DISTASO, J.A., and SCHLOSSMAN, S.F.:
Loss of suppressor T cells in active multiple sclerosis.
N. Engl. J. Med. 303: 125-129; 1980.

REINHERZ, E.L., RUBINSTEIN, A., GEMA, R.S., STRELKAUSKAS, A.J., ROSEN, F.S., and SCHLOSSMAN, S.F.:
Abnormalities of Immunregulatory T cells in disorders of immune function.
N. Engl. J. Med. 301: 1018-1022; 1979.

REINHERZ, E.L., KUNG, P.C., GOLDSTEIN, G., and SCHLOSSMAN, S.F.:
A monoclonal antibody reactive with the human cytotoxic / suppressor T cell subset previously defined by a hetero-antiserum termed TH 2.
J. Immunol. 124: 1301-1307; 1980.

REINHERZ, E.L., PARKMAN, R., RAPPEPORT? J., ROSEN, F.S., and SCHLOSSMAN, S.F.:
Aberrations of suppressor T cells in human graft-versus-host-disease.
N. Engl. J. of Med. 300:1061-1068; 1979.

REINHERZ, E.L., MORIMOTO, C., FITZGERALD, K.A., HUSSEY, R.E., DALEY, J.F., and SCHLOSSMAN, S.F.:
Heterogeneity of human T 4+ inducer T cells defined by a monoclonal antibody that delineates two functional subpopulations.
J. Immunol. 128: 463-468, 1982

REINHERZ, E.L., KUNG, P.C., GOLDSTEIN, G., and SCHLOSSMAN, S.F.:
A monoclonal antibody with selective reactivity

with functionally mature human thymocytes and all peripheral T cells.
J. Immunol. 123: 1312-1317, 1979.

REINHERZ, E.L., STRELKAUSKAS, A.J., O'BRIEN, C., and SCHLOSSMAN, S.F.:
Phenotypic and functional distinctions between the TH 2^+ and JRA $^+$ T cell subsets in man.
J. Immunol. 123: 83-86; 1979.

REINHERZ, E.L., KUNG, P.C., GOLDSTEIN, G., LEVEY, R.H., and SCHLOSSMAN, S.F.:
Discrete stages of intrathymic differentiation.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 1588-1592, 1980.

REINHERZ, E.L., KUNG, P.C., GOLDSTEIN, G., and SCHLOSSMAN, S.F.:
Separation of functional subsets of human T-cells by a monoclonal antibody.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 4061-4065; 1979.

REDER, A.T., ANTEL, J.P., OGER, J.J.-F., McFARLAND, T.A., ROSENKOETTER, M., and ARNASON, B.G.W.:
Low T 8 antigen density on lymphocytes in active multiple sclerosis.
Annual Neurol. 16: 242-249; 1984.

REUNANEN, Mauri J.:
Spontaneous proliferation of cerebrospinal fluid mononuclear cells in multiple sclerosis.
J. Neuroimmunol. 3: 275-283; 1982.

RICE, G.P.A., FINNEY, D., BRAHENY, S.L., KNOBLER, R.J., SIPE, J.C., and OLDSTONE, M.B.A.:
Disease activity markers in multiple sclerosis.

J. Neuroimmunol. 6: 75-84, 1984.

RICHERT, Y.R., ROSE, J.W., XIAN-HAU XU, GREENSTEIN, J.J., McFARLAND, H.F., and McFARLIN, D.E.:
Characterization of Cerebrospinal Fluid Lymphocytes in Multiple Sclerosis.
Annals of the N.Y. Acad. Sci. 436: 151-162; 1984.

SASSEN, A., and VAN DER PLAETSE, F.:
Detection and spontaneous alteration of lymphocyte antigens on slide smears.
Med. Microbiol. Immunol. 168: 129-137, 1980.

SANDBERG-WOLLHEIM, M.:
Lymphocyte populations in the cerebrospinal fluid and peripheral blood of patients with multiple sclerosis and optic neuritis.
Scand. J. Immunol. 17: 575-581, 1983.

SANTOLI, D., MORETTA, L., LISAK, R., GILDEN, D., and KOPROWSKI, H.:
Imbalances in T-cell subpopulations in multiple sclerosis patients.
J. of Immunol. 120: 1369-1371, 1978.

SANTOLI, D., DEFREITAS, E.C., SANDBERG-WOLLHEIM, M., FRANCIS, M.K., and KOPROWSKI, H.:
Phenotypic and functional characterization of t cell clones derived from the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients.
J. Immunol. 132: 2386-2392; 1984.

SAYK, J.:
Cytologie der Cerebrospinalflüssigkeit.
Fischer-Verlag, Jena 1960.

SCHÄDLICH, H.J., NEKIC, M., and FELGENHAUER, K.:
The detection of activated cerebrospinal fluid B-lymphocytes by peroxidase conjugated antibodies.
J. Neurol. 224: 77-87, 1980.

SCHÄDLICH, H.J., BLIERSBACH, Y., FELGENHAUER, K., and SCHIFFERDECKER, M.:
OKT 8 binding lymphocytes in diseases of the nervous system.
J. Neuroimmunol. 5: 289-294; 1983.

SCHLOTE, W., and ROSS, W.:
Gibt es ein charakteristisches Liquorzellbild bei der Multiplen Sklerose?
Nervenarzt 45: 576-587, 1974.

SCHNAPER, H.W., and AUNE, Th.M.:
Identification of the lymphokine soluble immune response suppressor in urine of nephrotic children.
J. Clin. Investig. 76: 341-349; 1985.

SCHWARZE, E.W.:
Zur Differenzierung der im Liquor cerebrospinalis des Menschen anzutreffenden Zellelemente.
Diss. Tübingen 1967.

SEIFERT, G., DENK, M., KLEIN,P.J., STEIN, H., and OTTO, H.F.:
Die Anwendung der Immunzytochemie in der praktischen Diagnostik des Pathologen.
Der Pathologe 5: 187-199; 1984.

SÖRNÄS, R.:
A new method for the cytological examination of the cerebrospinal fluid.

J. Neurol. Neurosury. Psychiatr. 30: 53-59; 1967.

STARK, E.:
Differenzierung von Oberflächenantigenen auf Liquorzellen mit monoklonalen Antikörpern.
Akt. Neurol. 12: 180-182; 1985.

STECK, A.J., and DE FLAUGERGUES, J.-Ch.:
Local and systemic immune response in multiple sclerosis: analysis of CSF inflammatory changes and peripheral blood T-cell subsets.
J. Neurol. 231: 126-129; 1984.

STERNBERGER, L.A.:
Immunochemistry 2nd edn.
Wiley and sons, New York, Chichester; 1979.

STRELKAUSKAS, CALLERY, R.T., McDOWELL,J., BOREL, Y., and SCHLOSSMAN, S.F.:
Direct evidence for loss of human suppressor cells during active autoimmune disease.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 5150-5154; 1978.

TAYLOR, B.B.:
Redistribution and pinocytosis of lymphocyte surface immunoglobulin molecules induced by anti-immunoglobulin antibody.
Nature 233: 225-227; 1971.

TAYLOR, C.R., CHIR, B., and PHIL, D.:
Immunoperoxidase Technique.
Arch. Pathol. Lab. Med. 102: 113-121; 1978.

TOSATO, G., MAGRATHH, J., KOSKI, J., DOOLEY, N., and BLAESE, M.:
Activation of suppressor T cells during Epstein-

Barr-Virus induced infectious mononucleosis.
N. Engl. J. Med. 301: 1134-1137; 1979.

TOURTELOTTE, W.W., and PARKER, J.A.:
Multiple Sclerosis: brain immunglobulin G and albumin.
Nature 214: 683-686, 1967.

TOURTELOTTE, W.A., and PARKER, J.A.:
Cerebrospinal fluid in multiple sclerosis, in:
Handbook of Clinical Neurology, Vol. 9.
Vinken and Bruyn (ebd.), 324-382; 1979.

TRAUGOTT, U., REINHERZ, E.L., and RAINE, C.S.:
Multiple Sclerosis: Distribution of T-cell subsets within active chronic lesions.
Science 219: 308-310, 1983.

VOSS, G.:
Über die Liquorcytologie des frühesten Stadiums der Multiplen Sklerose.
Nervenarzt 12:470-471; 1939.

WEINER, H.L., and HAUSER, S.L.:
Neuroimmunology I: Immunoregulation in Neurological disease.
Ann. Neurol. 11: 437-449; 1982.

WEINER, H.L.; HAFLER, D.A., FALLIS, F.J., JOHNSON, D., AULT, K.A., and HAUSER, S.L.:
T cell subsets in patients with multiple sclerosis.

Ann. N.Y. Acad. Scien. 436: 281-290; 1984.

WICK, G., and SCHAUENSTEIN, C.:
Immunfluoreszenzuntersuchungen in Hämatologie und Immunhämatologie (Laboratoriumsdiagnose 1), Huber, Patner, Gabl (eds.), Springer-Verlag, Berlin,1983, S. 435-468.

WURSTER, U., STARK, E., and ENGELHARDT, P.:
Liquorzytologie nach kombinierter Zentrifugation und Zytozentrifugation im Vergleich zur Sedimentation.
Ärztl. Lab. 30: 184-188; 1984.

YATA, J., TSUKIOTO, J., and TACHIBANA, T.:
Human lymphocyte subpopulations: human thymus-lymphoid tissue (HTL) antigen positive lymphocytes forming rosettes with sheep red blood cells and HTL negative lymphocytes interacting with antigen-antibody-complement complexes.
Clin. exp. Immunol. 14: 319-327; 1973.

LEBENSLAUF:

Am 4.3.1956 wurde ich als erstes Kind der Eheleute Dipl.Ing. Günter und Martha Basedow, geborene Betz in Bad Kreuznach geboren.

Ab dem 23.4.1963 besuchte ich die Christliche Simultanschule in Bingen am Rhein und wechselte am 4.12. 1966 auf das Mädchengymnasium der Englischen Fräuleins.

Dort bestand ich am 21.5.1975 das Abitur und begann am 1.10.1975 die Ausbildung zur Krankenschwester in Erlangen.

Nach dem Staatsexamen zur Krankenschwester im September 1978 studierte ich ab dem 1.10.1978 in Regensburg Humanmedizin. Nach dem Physikum am 26.8.1980 setzte ich mein Studium an der Freien Universität in Berlin fort. Am 10.9.1981 legte ich den 1. Abschnitt des Ärztlichen Examens ab, am 20.3.1984 den 2. Abschnitt und beendete am 21.5.1985 mein Studium mit dem mündlichen Abschlußexamen an der Freien Universität Berlin.

Seit Juni 1985 arbeite ich als Assistenzärztin an der Neurologischen Abteilung der Universtitätsklinik Großhadern in München.

Papyrus-Druck GmbH Berlin ☎ 3416451
Dissertationen